SUR
LA MÉTHÉMOGLOBINE

DU MÊME AUTEUR

Sur la solubilité de la benzophénone. *C. R. Académie des Sciences*, 1900 (*T.* 130, *p.* 731).

Sur un nouveau dérivé de la benzophénone (*avec M. le professeur Œchsner de Coninck*). *C. R. Académie des Sciences*, 1900 (*T.* 130, *p.* 1768).

En collaboration avec M. le professeur Ville :

Sur la spectroscopie du sang. Préparation du réducteur de Stokes. *Montpellier médical*, 1902.

Conditions d'application du procédé de Mohr direct, dans le dosage du chlore urinaire. *Société de Biologie*, 1904 (*T.* 56, *p.* 668).

Sur le dosage des chlorures dans l'urine. *Bullet. Société chimiq.*, 1904 (3), 31, *p.* 581.

Sur le dosage du chlore urinaire. *Montpellier médical* 1904, et *Bull. de Pharmacie du Sud-Est*, 1904.

Modification du spectre de la méthémoglobine sous l'action du fluorure de sodium. *C. R. Académie des Sciences*, 1905 (*T.* 140, *p.* 743).

Sur la véritable nature d'une nouvelle bande signalée dans le spectre d'absorption du sang. *Montpellier médical*, 1905.

Sur une combinaison fluorée de la méthémoglobine. *C. R. Académie des Sciences*, 1905 (*T.* 140, *p.* 1195).

Sur la méthémoglobine et sa combinaison fluorée. *C. R. Académie des Sciences*, 1905 (*T.* 140, *p.* 1549).

Sur la méthémoglobine fluorée. *Bullet. Soc. chimique*, 1905 (*T.* 33, *p.* 854).

Nouveau procédé de recherche du fluor dans les substances alimentaires. *Société chimiq. Sect. Montpellier*, 15 *Décembre* 1905. *Bullet. Soc. chim.*, 1906.

SUR

LA MÉTHÉMOGLOBINE

THÈSE

résentée et publiquement soutenue à la Faculté de Médecine de Montpellier

Le 24 Février 1906

PAR

Eugène DERRIEN
LICENCIÉ ÈS SCIENCES
PRÉPARATEUR CHARGÉ DE LA DIRECTION DES TRAVAUX PRATIQUES
DE CHIMIE BIOLOGIQUE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER
Né à Oran (Algérie), le 19 août 1879

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

MONTPELLIER
SOCIÉTÉ ANONYME DE L'IMPRIMERIE GÉNÉRALE DU MIDI
—
1906

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

MM. MAIRET (✻)............... DOYEN
TRUC..................... ASSESSEUR

PROFESSEURS :

Clinique médicale............................	MM. GRASSET (✻).
Clinique chirurgicale............................	TEDENAT.
Thérapeutique et Matière médicale	HAMELIN (✻).
Clinique médicale	CARRIEU.
Clinique des maladies mentales et nerveuses..........	MAIRET (✻).
Physique médicale	IMBERT.
Botanique et Histoire naturelle médicale.............	GRANEL.
Clinique chirurgicale............................	FORGUE (✻).
Clinique ophtalmologique.........................	TRUC.
Chimie médicale............................	VILLE.
Physiologie............................	HEDON.
Histologie............................	VIALLETON.
Pathologie interne............................	DUCAMP.
Anatomie............................	GILIS.
Opérations et Appareils.........................	ESTOR.
Microbiologie............................	RODET.
Médecine légale et Toxicologie....................	SARDA.
Clinique des maladies des enfants..................	BAUMEL.
Anatomie pathologique.........................	BOSC.
Hygiène............................	BERTIN-SANS H
Clinique d'accouchements.........................	VALLOIS.

Professeur adjoint : M. RAUZIER.
Doyen honoraire : M. VIALLETON.
Professeurs honoraires : MM. JAUMES, PAULET (O. ✻), BERTIN-SANS E. (✻), GRYNFELTT.
Secrétaire honoraire : M. GOT

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES

Accouchements............................	MM. N.
Clinique ann. des mal. syphil. et cutanées....	VEDEL agrégé.
Clinique annexe des maladies des vieillards....	RAUZIER, professeur adjoi
Pathologie externe............................	JEANBRAU, agrégé.
Pathologie générale............................	RAYMOND, agrégé.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DE ROUVILLE.	MM. VEDEL.	MM. SOUBEIRAN.
GALAVIELLE.	JEANBRAU.	GUÉRIN.
RAYMOND.	POUJOL.	GAGNIÈRE.
VIRES.	ARDIN-DELTEIL.	ED. GRYNFELTT.

M. IZARD, *Secrétaire.*

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. VILLE, Professeur, *Président.*	MM. VIRES, Agrégé.
H. BERTIN-SANS, Professeur.	ARDIN-DELTEIL, Agrégé.

La Faculté de Médecine de Montpellier déclare que les opinions émises dans Dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à l' auteur ; qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A ma Femme

E. D.

A Monsieur le Professeur J. VILLE

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Hommage de vive reconnaissance et d'affectueux attachement de son préparateur et élève.

E. Derrien

A MES MAITRES

DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DES SCIENCES D'ALGER

DES FACULTÉS DES SCIENCES DE MONTPELLIER ET DE BORDEAUX

DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

ET DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE DE MONTPELLIER

E D

SUR

LA MÉTHÉMOGLOBINE

INTRODUCTION

L'étude de la méthémoglobine n'occupe évidemment qu'une place restreinte dans le domaine si vaste et encore si inexploré de la chimie du sang. Le chercheur attiré vers elle par la simplicité apparente de la méthode d'investigation, utilisée par ses devanciers, y pénètre à la lumière d'un prisme et n'y rencontre que des spectres, des ombres... sous lesquels la réalité chimique se dérobe d'une façon décevante... Et cependant, l'intérêt *scientifique* de cette étude — quand elle sera suffisamment avancée — ne sera pas seulement celui d'une collection de faits curieux ou d'une monographie sans portée; j'essaierai de montrer comment on peut déjà s'y élever, *parfois*, à des considérations générales sur la Biologie du sang.

Au point de vue *pratique*, cette étude peut avoir quelque utilité. Certes, l'*hématologie médicale* contemporaine, prenant un grand essor sur des terrains plus larges, plus féconds et aussi plus en faveur (formules hémoleucocytaires, biochimie du globule blanc, étude des propriétés biologiques du sérum...) paraît délaisser la méthémoglobine et ne plus

la maintenir, par des progrès nouveaux dans son étude, à la place que lui donnait Hayem en 1889 [1].

J'ai essayé de rassembler dans un chapitre « La méthémoglobine en médecine » les notions utiles qui dérivent de la connaissance de cette altération de la matière colorante du sang. On verra aussi que l'*hygiène* sera redevable à la *méthémoglobine* d'une nouvelle méthode — rapide et facile — pour la recherche des antiseptiques, illicitement introduits dans les substances alimentaires, qui étaient jusqu'à présent les plus difficiles à y déceler, — les fluorures.

Mais il semble que la méthémoglobine doive toujours se ressentir des hésitations premières de Hoppe-Seyler, qui la découvrit (1865) ; et, malgré les travaux qui se sont attachés à établir son individualité chimique, des doutes se renouvellent de temps à autre sur son existence. Tout récemment encore, en examinant au spectroscope les liquides sous une grande épaisseur, on signala la bande de la méthémoglobine dans les spectres d'aborption du sang laqué et des solutions d'oxyhémoglobine. Cette bande était présentée comme nouvelle et appartenant à l'oxyhémoglobine. Ce qui conduisit les auteurs de cette découverte à nier ensuite l'existence de la méthémoglobine.

J'étudiais, en ce moment, en collaboration avec mon Maître, M. le professeur Ville, l'action du fluorure de sodium sur la méthémoglobine ; et comme cette action était spectroscopiquement la même sur la bande de la méthémoglobine et sur la « nouvelle » bande de l'oxyhémoglobine, il nous fut facile de mettre d'accord les observations en question et les données classiques.

C'est l'exposé de ces recherches et de ces critiques — et

[1] Il est intéressant de comparer à ce point de vue le traité de Hayem (*Du sang*, Paris, 1889) et le récent livre de MM. Bezançon et Labbé (*Traité d'hématologie*, Paris, 1904).

le développement de leurs conséquences — qui sont la raison d'être de cette thèse et qui en constituent plus particulièrement la partie originale.

Je l'ai fait précéder d'un essai de coordination et de critique des travaux récents sur la méthémoglobine. Il s'est forcément glissé, là aussi, quelques indications nouvelles et certains aperçus incomplets que je me propose de reprendre plus tard. Cette première partie commence au point où l'avait laissée la thèse qu'un de mes maîtres les plus estimés, M. le professeur Henri Bertin-Sans, soutenait ici-même, il y a dix-huit ans. Pour la première fois alors, toute la question de la méthémoglobine était méthodiquement examinée, expérimentalement critiquée et judicieusement mise au point. Aussi est ce pour moi un plaisir de remercier aujourd'hui M. le professeur Bertin-Sans d'avoir bien voulu être l'un des juges d'une dissertation inaugurale qui se rattache si étroitement à la sienne.

Si le présent travail a quelque mérite, si même il a vu le jour, il le doit aux conseils et surtout à l'impulsive collaboration initiale de mon excellent Maître, M. le professeur Ville qui, pendant les cinq années que je viens de passer auprès de lui, comme préparateur, a mis toute sa bienveillance à m'armer pour l'étude pénible, obscure, mais si passionnante de la chimie des êtres vivants, — qui maintes fois m'a fait le grand honneur de m'associer à ses travaux, — et dont la belle ténacité au travail et le rigoureux esprit de contrôle expérimental seront toujours pour moi un exemple qui me gardera des découragements trop prompts et des écarts d'une imagination trop vive. Il a droit à toute ma reconnaissance et je suis heureux de pouvoir ici la lui exprimer de tout cœur.

PREMIÈRE PARTIE

LA MÉTHÉMOGLOBINE

d'après les travaux récents [1]

Etude documentaire et critique contenant quelques observations et expériences nouvelles

A. — AGENTS MÉTHÉMOGLOBINISANTS

On donne le nom d'« agents méthémoglobinisants » aux substances chimiques, aux formes de l'énergie et aux conditions physiques ou physiologiques, sous l'influence desquelles la matière colorante du sang se transforme en méthémoglobine.

Leur nombre, déjà très grand en 1888, s'est encore accru depuis. Il est si facile de voir si une action physique, chimique ou biologique sur l'hémoglobine se traduit spectroscopiquement par l'apparition d'une bande d'absorption dans le rouge! Ce qui fait que bien des études, à peu près bornées

[1] Pour tout ce qui est antérieur à 1888 se rapporter au travail de H. Bertin-Sans : *Etudes sur la méthémoglobine* (Thèse médecine, Montpellier 1887-1888, n° 51). Consulter aussi les deux mises au point parues depuis en France : un chapitre de l'Encyclopédie chimique de Frémy (Chimie physiologique, 2e fasc., 3e partie, pp. 64-76) [1895] et surtout l'article récent [1902] du 2e suppl. du Dict. de Würtz (43e fasc., pp. 63-70), dus tous deux à la plume si autorisée du professeur Lambling, de Lille.

à cette constatation, restent superficielles et que bien des agents dits méthémoglobinisants peuvent avoir une action plus complexe sur la matière colorante du sang.

Dans un coup d'œil d'ensemble sur tous les agents signalés par les auteurs comme opérant la transformation de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine, ce qui frappe, — en plus de leur multiplicité — c'est leur caractère disparate : chaleur, radiations, dessiccation, vide, oxydants, réducteurs, acides, bases, substances chimiquement neutres ou indifférentes, toxines, microbes....

Si bien qu'on ne saurait établir de relation chimique entre leur action et la transformation de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine.

Cette simple énumération amène donc à penser déjà que l'oxyhémoglobine doit avoir une tendance naturelle à passer de l'état instable et vivant, sous lequel elle existe dans les conditions physiologiques, à l'état inerte de méthémoglobine plus stable, lorsque ces conditions physiologiques ne sont plus remplies. En fait, on avait remarqué depuis longtemps, par les méthodes ordinaires, que l'oxyhémoglobine abandonnée à elle-même est toujours, au bout d'un certain temps, au moins partiellement méthémoglobinisée [1]. Les agents méthémoglobinisants ne feraient que faciliter ou exagérer cette tendance. Ils ne seraient que des «activeurs». On s'expliquerait ainsi qu'ils puissent être si nombreux et si divers.

a. — Agents physiques

Plusieurs d'entre eux interviennent — souvent à l'insu de l'opérateur — dans la préparation même des cristaux

Cf. O. Cohnheim, Chemie der Eiweisskörper. 2te Aufl., p. 243 (1904.

d'oxyhémoglobine. Si l'on filtre des solutions d'oxyhémoglobine, les bords du filtre se colorent en brun (méthémoglobinisation par *dessiccation*) ; si l'on veut *redissoudre*, surtout en opérant vers 37° comme le recommandent certains auteurs, les cristaux d'une première cristallisation pour en effectuer une seconde : apparition de méthémoglobine [1].

L'action méthémoglobinisante de la *dessiccation* et du *vide* a été signalée dès 1865 par Hoppe-Seyler, qui indiqua que l'oxyhémoglobine ne peut être desséchée, sans altération, qu'au-dessous de 0°. Bertin-Sans vérifia l'action méthémoglobinisante de la dessiccation sur papier filtre [2]. J'ai pu constater une action semblable, encore plus accentuée peut-être, de la part des corps poreux tels que la porcelaine dégourdie.

Lambling [3] a étudié l'action du *vide*. Lorsque le sang est soumis à l'action du vide (et de la chaleur), une partie de l'oxygène libéré se refixe toujours sur le pigment sanguin en le transformant en méthémoglobine. Cette production de méthémoglobine est surtout sensible lorsqu'on interrompt l'extraction des gaz pendant un certain temps, en abandonnant le sang dans un vide partiel à 40°. Dans ces conditions, et en opérant avec des solutions d'oxyhémoglobine, près de la moitié de l'oxygène peut disparaître pendant l'extraction, formant de la méthémoglobine qui, on le sait, résiste parfaitement à l'action du vide. Si l'extraction des gaz est menée très rapidement, il ne se fait pas de méthémoglobine en quantité appréciable à l'examen spectroscopique ordinaire. Tandis que cet examen donne un résultat nettement positif pour des extractions lentes faites vers 60°.

[1] Cf. Thèse Bertin-Sans, pp. 33-34.
[2] *Id.*, p. 91.
[3] Soc. Biol. **1888**, 473 et **1889**, 65.

L'élévation de *température,* qui favorise ainsi les autres actions méthémoglobinisantes, peut à elle seule suffire.

Dittrich [1] étudia son influence sur du sang dilué à 1/70. La bande dans le rouge apparaît (à l'examen spectroscopique sous 1cm) au bout de :

17 heures	....	à 48°
2 jours	....	38°
4 —	....	25°
9 —	....	20°

Elle n'était pas encore apparue au bout de 14 jours pour le sang dilué maintenu à 0°.

Dittrich n'a pas recherché s'il existe une température *critique* au-dessous de laquelle l'oxyhémoglobine dissoute ne se transformerait plus spontanément en méthémoglobine.

D'autre part, si l'on élève trop la température, il se fait de l'hématine.

Dittrich fait suivre ses expériences de considérations intéressantes. Il fait remarquer notamment [2] que la méthémoglobinisation, étant fonction de la température, se rapproche d'autres transformations, chimiquement connues, qui tendent spontanément à s'effectuer sous l'action de la chaleur, par exemple :

Cyanate d'ammonium → urée
Ethers rhodaniques → sénévols
Méthylaniline → toluidine... etc.

Transformations où, comme dans la méthémoglobinisation, la substance résultante présente en somme plus de résistance aux influences modifiantes que la substance primitive.

[1] Arch. exp. Path. u. Pharmak. **29**, 258 (1891).
[2] *Loc. cit.* p. 262.

Ces analogies sont importantes pour l'étude de la constitution de la méthémoglobine.

Mais DITTRICH ne s'est point mis à l'abri de l'intervention possible des microbes, dont le développement est aussi fonction de la température.

C'est pourquoi nous avons été amenés, le professeur VILLE et moi, [1] à vérifier cette *action méthémoglobinisante de la chaleur en opérant dans des conditions d'asepsie rigoureuse* [2] :

Le sang était puisé directement dans le cœur d'un cobaye vivant, suivant la technique connue. Des tubes de Violette, de 3^{cm} de diamètre, et contenant $50^{cc.}$ d'eau distillée pure, avaient été préalablement stérilisés à l'autoclave à 120°. On introduisait dans chacun $1/2^{cc.}$ de sang de façon à avoir une dilution au 1/100. Des tubes furent placés dans la chambre-étuve à 38°. D'autres restèrent à la température du laboratoire. L'asepsie fut parfaite. Ces expériences eurent lieu au mois de mai 1905. Les tubes conservés sont encore aujourd'hui absolument limpides. Pour les tubes placés à 38°, la bande de la méthémoglobine ($\lambda = 634$) commence à se laisser apercevoir au spectroscope après 36 heures environ et devient nette au bout de 48 heures. Tandis que les tubes témoins, laissés à la température du laboratoire (qui oscillait alors autour de 20°) ne commençaient à présenter une faible absorption dans le rouge qu'au bout de 3 ou 4 jours.

On attribue à cette action de la *chaleur* la méthémoglobinisation spontanée des solutions d'oxyhémoglobine abandonnées à elles-mêmes (DITTRICH). Les anciens auteurs faisaient jouer un rôle plus important à la présence de l'air, surtout ceux qui pensaient que la méthémoglobine était un

[1] Ville et Derrien. C. R. **140**, 1549 (5 juin 1905).

[2] Nous tenons à remercier ici M. le docteur Galavielle, professeur agrégé, et M. le docteur Lagriffoul, chef des travaux de Microbiologie, de l'aide aimable et précieuse qu'ils nous ont prêtée pour mener à bien ces expériences.

peroxyde d'hémoglobine. Certains auteurs, comme Formanek [1], semblent attribuer une action méthémoglobinisante à la lumière.

La *lumière* seule serait inactive. C'est ainsi qu'une exposition, même prolongée, au rayonnement d'une source intense (lumière de l'arc), ne modifie pas le spectre d'une solution de sang, *maintenue à* 0°, et ne présentant pas déjà d'absorption dans le rouge (sous 20^{cm}) [Piettre et Vila] [2].

Certaines *radiations* peuvent cependant avoir une action méthémoglobinisante. Par exemple les *radiations du radium*, d'après V. Henri et A. Mayer, [3] transforment peu à peu l'hémoglobine en méthémoglobine en même temps qu'elles diminuent la solubilité de ce corps.

b. — Agents Chimiques

Pendant longtemps, à la suite des controverses sur le degré d'oxydation de la méthémoglobine, les substances méthémoglobinisantes furent classées en *oxydants* et *réducteurs*.

Bien des ouvrages classiques portent encore le reflet de cette époque. Et suivant que l'auteur considérait la méthémoglobine comme un sous-oxyde ou comme un peroxyde d'hémoglobine, une même substance pouvait être rangée dans l'une ou l'autre classe.

Ainsi le *Palladium hydrogéné*, considéré par les uns comme un *réducteur* indéniable, devenait pour les autres un *oxydant*, car, disaient ceux-ci, l'hydrogène occlus dissociable décompose la molécule O^2 dissoute et libère de l'oxygène

[1] Cf. Jahresb., f. Tierchem **31**, 223 (1901).

[2] C. R. **140**, 1060 (Avril 1905).

[3] Soc. Biol. **1903**, 1412.

actif O. On voit donc combien il est difficile de classer chimiquement les agents méthémoglobinisants.

Voici la classification proposée par Dittrich, qui fit, en 1891, une étude sur les poisons méthémoglobinisants (*Ueber methæmoglobinbildende Gifte*)[1] à laquelle renvoient souvent les auteurs allemands :

Méthémoglobinisants	1° oxydants.	Brome, I + IK, chlorates, nitrites, MnO^4K, nitroglycérine, composés organiques nitrés, etc.
	2° réducteurs	H naissant, Palladium hydrogéné, pyrogallol, hydroquinone, pyrocatéchine, alloxantine, etc.
	3° ni l'un ni l'autre	Sels d'aniline, toluidine, acétanilide, acetphénétidine, sulfate ammonique, etc... (température, dessiccation, vide).

Cette classification montre que des substances qui ne sont ni oxydantes ni réductrices peuvent avoir une action méthémoglobinisante, et comme, d'autre part, la division en oxydants et réducteurs est artificielle et élastique, c'est donc à un point de vue auquel il ne conviendrait peut-être plus de se placer pour l'étude de la méthémoglobine.

Dittrich essaya aussi de classer les substances méthémoglobinisantes d'après la vitesse d'apparition de la bande dans le rouge. On savait déjà que la rapidité d'action varie avec la nature de l'agent méthémoglobinisant. Bertin-Sans a vérifié que l'eau iodée et le chlorate de potassium agissent bien moins rapidement que le permanganate et le ferricyanure de potassium.

Voici, d'après Dittrich[2], un groupement à ce point de vue :

[1] Arch, f. exp. Path. u. Pharmak. **29**, 256.
[2] *Loc. cit.*, p. 259.

Action rapide......	MnO^4K, ferricyanure de K, *ferrocyanure de K*, *nitrite de K*, chlorhydrate d'hydroxylamine.
Action plus lente, mais encore rapide...	Térébenthine vieille, Phénylhydrazine. Acide gallique.
Après 1/2 heure..	Chlorate de K.
Après 24 heures...	Acide picrique, naphtol, acide chrysophanique, phloroglucine, bisulfite de Na, acétanilide, pyrogallol, antimoniate de K, $CaCl^2$.
Après 24 heures, mais à 37-38°........	Saccharose, glycérine.
Sans action : pas plus de bande dans le rouge qu'avec les tubes témoins..............	Ether, phosphore en morceaux, β naphtol, résorcine, formiate de Na, arséniate de K, chlorhydrate de phénylhydrazine

Quelques remarques sur ce tableau :

Le ferrocyanure de potassium auquel Dittrich attribue une action rapide est, d'après Hüfner[1], complètement inactif. Les *nitrites* ont une action plus complexe sur laquelle je reviendrai. Hüfner s'étonne de l'action méthémoglobinisante du *chlorhydrate d'hydroxylamine*, et pense que ce composé agit en libérant HCl. Il peut donc n'être pas un simple méthémoglobinisant. En fait, les dilutions sanguines, traitées par le chlorhydrate d'hydroxylamine, si elles donnent d'abord un spectre ressemblant à celui de la méthémoglobine, ne tardent pas à devenir visqueuses et verdâtres.

D'autre part, les *formiates* et le *chlorhydrate de phénylhydrazine*, sans action pour Dittrich, seraient méthémoglobinisants pour A. von Vorkampff-Laue[2]. L'*éther*, sans action pour Dittrich, serait, pour Mayet[3], une cause de méthémoglobinisation plus facile des cristaux d'oxymoglobine préparés après laquage des hématies par cet agent.

[1] Engelmann's Archiv. f. Physiologie, **1899**, 495.

[2] Inaug.-Dissertat, Med. Dorpat, **1892**.

[3] C. R. **109**, 156 (1889).

Mais il n'y a rien d'étonnant à ce que des auteurs différents obtiennent des résultats contradictoires; la vitesse d'apparition de la bande de la méthémoglobine dépendant d'une foule de variables, pouvant agir simultanément, et indépendantes les unes des autres dans leurs variations. Les résultats diffèrent, suivant la température du moment, suivant que l'on opère avec des solutions d'oxyhémoglobine ou des dilutions sanguines, suivant l'animal qui fournit le sang, suivant le procédé de préparation des cristaux d'oxyhémoglobine, suivant même la façon dont aurait été distillée l'eau qui sert aux dilutions...

Ce dernier point résulte d'un travail d'Eschbaum [1] d'après lequel les dilutions sanguines faites avec l'eau distillée commerciale sont le siège d'une méthémoglobinisation rapide, tandis qu'au contraire, avec l'*eau distillée pure* (suivant Stas), la transformation ne se fait que peu à peu et sans rapport avec la quantité d'eau ajoutée. Eschbaum pensait que l'eau distillée ordinaire doit son action aux traces de cuivre provenant des alambics. Hypothèse plausible depuis que nous connaissons la sensibilité des substances biologiques aux doses infinitésimales de certains éléments chimiques [2].

Après ce qui a été dit de l'action de la chaleur, il est aisé de comprendre que les substances méthémoglobinisantes doivent agir plus ou moins rapidement suivant la température. Menzies[3], qui fit des expériences tantôt à la température du laboratoire, tantôt au bain-marie à 37°-40°, trouva que, dans ce dernier cas, la transformation était toujours plus rapide.

[1] Deutsch. med. Wochenschr. **1895**, 106-107 (cité d'après *Jahresb. Tierchem*, **25**, 108.).

[2] Rôle activant de traces de Mn pour la laccase (G. Bertrand); action empêchante justement de traces de cuivre sur l'amylase (Ewert) [Cf. *Bull. Inst. Pasteur*, **2**, 719 et *Revue gén. des Sciences*, 30 Mai **1905**, pp. 460-461].

[3] *On the methæmoglobin*. Jour. of. Physiol., **17**, 402 (1895).

Si l'on opère avec des solutions d'oxyhémoglobine cristallisée, leur méthémoglobinisation se fera plus ou moins vite, suivant le procédé de cristallisation employé. Pour Mayet[1] les cristaux obtenus après laquage à l'éther se méthémoglobinisent plus rapidement que ceux obtenus en remplaçant l'éther par la benzine. L'action de l'alcool, dans ces préparations, n'est pas non plus indifférente[2]. Le procédé de Schulz au sulfate ammonique donne des cristaux qui se méthémoglobinisent si bien qu'il a pu être proposé, comme on le verra, comme procédé d'obtention de la méthémoglobine cristallisée.

J'ai été conduit aux autres assertions (différences suivant que l'on opère sur du sang ou de l'oxyhémoglobine, et suivant l'animal) en étudiant l'**action du Palladium hydrogéné**[3] :

En opérant d'après les indications de Hoppe-Seyler[4], mes premières expériences me donnèrent des résultats tout à fait opposés à ceux obtenus par le célèbre biochimiste allemand. Avec des lames de Palladium fortement chargées, il se faisait de l'hémoglobine réduite et la bande de la méthémoglobine n'apparaissait que très tardivement et seulement si l'on laissait pénétrer de l'air. J'ai pensé alors que l'expression de « fortement chargé » (strark beladenes), employée par Hoppe-Seyler, ne correspondait pas aux chargements intenses que j'obtenais avec une dérivation du courant de la ville,

[1] C. R. **109**, 156 (1889).

[2] L'alcool est signalé comme méthémoglobinisant dans la thèse d'A. von Vorkampff-Laue (Med. Dorpat, 1892).

[3] Étude faite dans le laboratoire de M. le professeur Ville, et sous sa direction, et que je résume ici d'après notre cahier d'expériences (hiver 1902).

[4] Zeitschr. f. physiol. Chem., **2**, 151 (1878-79). « Bringt man in eine verdünnte Lösung von Oxyhämoglobin in einer ganz damit gefüllten Flasche ein mit Wasserstoff *stark beladenes* Palladiumblech, so bildet sich *sehr schnell* Methämoglobin und der ganze Farbstoff wird allmälig in Methämoglobin umwandelt, wenn die Memge des Farbstoffs nich relativ zu gross ist ; *Hämoglobin habe ich daneben zunächst nicht entstehen gesehen* ».

et j'ai opéré avec des lames de Palladium chargées seulement jusqu'à ce que l'hydrogène commence à se dégager, ou bien avec les mêmes lames, plongées, après l'électrolyse, dans l'eau distillée et utilisées quand il ne se dégageait plus spontanément d'hydrogène. Je me suis ainsi rapproché de l'action très rapide signalée par Hoppe-Seyler. (Les lames étaient toujours bien lavées pour ne pas introduire d'acide ; j'ai obtenu, d'ailleurs, les mêmes résultats avec des lames chargées par électrolyse alcaline.)

On sait que le Palladium hydrogéné est formé par la juxtaposition de deux solutions solides ayant en hydrogène une teneur différente, et se dissociant plus facilement l'une que l'autre (Bakhuis Roozboom et Hoitsema)[1]. La première, sursaturée dans mes premières expériences, donnerait surtout de l'hémoglobine réduite, et c'est la seconde, correspondant à l'ancien hydrure de Palladium Pd^2H de Troost et Hautefeuille qui serait méthémoglobinisante.

Quoi qu'il en soit, ce que je voulais surtout signaler ici, ce sont les différences obtenues dans la rapidité d'apparition de la bande de la méthémoglobine suivant que j'opérais avec des solutions de cristaux d'oxyhémoglobine ou avec du sang défibriné dilué, et suivant l'animal qui fournissait le sang.

Avec des lames de Palladium identiques, chargées de la même façon, et des dilutions correspondant à une teneur en oxyhémoglobine constante (coloration du sang dilué au 1/100) la bande de la méthémoglobine apparaissait (liquides examinés sous 15^{mm}) au bout d'environ :

5 minutes avec les solutions de cristaux d'oxyhémoglobine de chien.
10 — — — — cheval.
3 heures avec du sang défibriné dilué de mouton.
3 — — — chien.
9 — — — bœuf.
12 — — — cheval.

Ces différences doivent tenir sans doute à ce que chaque espèce animale a son oxyhémoglobine spéciale, et pour le sang, aussi, à la variabilité de son alcalinité avec les espèces.

[1] Cf. Duhem. Thermodynamique et Chimie, Paris, 1902, pp. 174 179.

On n'a pas, jusqu'à ce jour, trouvé de substance méthémoglobinisante nouvelle dont l'action soit comparable à celle du ferricyanure de potassium qui reste le méthémoglobinisant type.

[LAPICQUE et VAST[1] ont reconnu la formation de méthémoglobine dans l'action de la *toluylènediamine* sur le sang. GAUTIER Cl. et CORELIER[2] ont cru devoir signaler récemment l'action méthémoglobinisante des *tanins* déjà indiquée comme faible par A. VON VORKAMPFF-LAUE (Thèse Dorpat, 1892). BERGELL et PSCHORR[3] ont montré que l'*acide phénanthrène-quinone 3-sulfonique* se comporte comme un toxique du sang qu'il charge de méthémoglobine et qu'il doit sans doute cette action à sa fonction quinonique... Citons enfin l'action méthémoglobinisante de quelques venins, comme le *venin de crapaud* (A. PUGLIESE)[4] et comme l'*échidnase* (PHYSALIX)[5].]

En revanche, certaines substances méthémoglobinisantes ont été étudiées de plus près dans leur action sur la matière colorante du sang :

Action des ferricyanures alcalins

En 1891, MM. H. BERTIN-SANS et J. MOITESSIER[6] montraient que le ferricyanure de potassium transforme la *carboxyhémoglobine* en méthémoglobine ordinaire en libérant l'oxyde de carbone. Ils en tirèrent un nouveau procédé de recherche de CO dans le sang, mais point de déductions théoriques.

[1] Soc. biol., **51**, 369-70 (1899).

[2] Soc. Biol. **57**, 433 (1904).

[3] Zeitschr. physiol. Chem., **38**, 16 (1903).

[4] Sull'azione methemoglobinica del veneno del rospo [Arch. di farmac. et terap. **2** (1894)].

[5] C. R. **135** 259, (1902).

[6] C. R., **113**, 210 (27 juillet 1891).

On pouvait cependant déjà prévoir que le ferricyanure devait se comporter vis-à-vis de l'*oxyhémoglobine* de la même façon et libérer l'oxygène dissociable, comme il détache l'oxyde de carbone qui remplace cet oxygène dans la carboxyhémoglobine. Ce n'est qu'en 1898 qu'un physiologiste d'Oxford, J. HALDANE [1], remarqua le dégagement gazeux qui se fait dans une solution d'oxyhémoglobine lorsqu'on la méthémoglobinise par le ferricyanure de potassium, et démontra que ce gaz était de l'oxygène pur et correspondait quantitativement à l'oxygène labile de l'oxyhémoglobine [2]. Un peu plus tard, et sans connaître le travail anglais antérieur, R. VON ZEYNEK [3] obtenait les mêmes résultats à l'Institut de chimie physiologique du professeur HÜFNER (Tübingen) qui les vérifiait [4]. On verra l'importance de cette découverte pour les tentatives théoriques sur la constitution de la méthémoglobine et le mécanisme de sa formation. Il devient donc intéressant d'étudier les dégagements gazeux dans l'action des divers méthémoglobinisants sur l'oxyhémoglobine. Cette étude est encore incomplète. HALDANE observa un faible dégagement gazeux avec le permanganate de potassium, une effervescence avec le chlorhydrate d'hydroxylamine, mais qui n'est pas seulement due à de l'oxygène, et aucune mise en liberté de gaz avec le nitrite de sodium. VON ZEYNEK [5] fit des expériences quantitatives avec

[1] A contribution to the chemistry of haemoglobin and its immediats derivatives Journ. of Physiology, **22**, 298 (février 1898).

[2] HALDANE appuie sa démonstration justement sur le fait antérieurement découvert par H. BERTIN-SANS et J. MOITESSIER (mais sans les citer) que le ferricyanure libère de même l'oxyde de carbone de la carboxyhémoglobine.

[3] Neue Beobachtungen und Versuche über das Methämoglobin und seine Bildungsweise. Engel. Archiv. f. Physiol., **1899**, 467-490.

[4] Nachträgliche Bemerkungen zu Dr v. Zeynck's Versuchen, die die Bildung des Methämoglobins betreffen. Engelm. Archiv. f. Physiol., **1899**, 491.

[5] *Loc. cit.*, p. 487.

le permanganate de potassium et avec le nitrite de sodium. MnO^4K agit tout à fait comme le ferricyanure. NO^2Na ne libère aucun gaz.

Action des nitrites

Gamgee, qui observa le premier (1866) la modification subie par le sang sous l'influence des nitrites, avait d'abord pensé à une combinaison de l'hémoglobine avec l'acide nitreux : la *nitrithémoglobine*. Selon Hoppe-Seyler, il se ferait sous l'action des nitrites un peu d'hématine en plus de la méthémoglobine[1]. Ce qui n'empêcha point la plupart des auteurs (Giacosa, Dittrich, Menzies, Hénocque, etc.) de ranger les nitrites parmi les méthémoglobinisants types. Hayem[2] observa bien les différences spectrales qui existent entre les solutions sanguines traitées par le nitrite de sodium et celles méthémoglobinisées par le ferricyanure : il attribuait ces différences à l'alcalinité des solutions de nitrite. J. Haldane reprit en 1897 l'étude de cette question en collaboration avec Makgill et Mavrogordato[3]. Les dilutions sanguines traitées par un nitrite sont plus roses que les mêmes méthémoglobinisées par le permanganate, l'iode, le ferricyanure ou les acides dilués. Au spectroscope, la bande dans le rouge est plus faible et les deux bandes entre D et E sont plus accusées. Ces phénomènes ne sont pas dus à la présence de méthémoglobine alcaline, car ils persistent en présence d'un léger excès d'acide acétique. J. Haldane et ses collaborateurs ont alors remarqué que ces deux bandes entre D et E répondaient à la position des bandes de l'*azoxyhémoglobine* (ou

[1] Th. Berlin-Sans, p. 34.

[2] P. 877 de son Traité *du sang* (1899).

[3] The products formed by the action of nitrites on haemoglobin. J. of Physiol. **21**, 165.

hémoglobine bioxyazotée) — et ont obtenu un liquide de même coloration et de même spectre que le produit de l'action des nitrites en faisant une solution mixte de une partie d'azoxyhémoglobine pour trois de méthémoglobine. Sous l'influence des réducteurs ou de la putréfaction, les dilutions sanguines contenant un excès de nitrite donnent finalement le spectre de l'*azoxyhémoglobine*. Le *nitrite d'amyle* [1], s'il n'est pas en trop grand excès, se comporte comme le nitrite de sodium.

Action des acides

L'action des acides sur la matière colorante du sang est variable suivant la concentration des solutions acides, comme le montra d'abord RAY LANCASTER (1870). On admet généralement que les acides faibles, même CO^2, ou dilués, donnent seuls de la méthémoglobine, les acides forts ou plus concentrés décomposant le pigment sanguin en hématine et substance protéique. (Les acides encore plus concentrés arrachent le fer à l'hématine pour donner de l'hématoporphyrine.) Il est probable qu'il existe des zones, dans l'action des acides suivant leur concentration, où ces réactions peuvent s'établir simultanément. C'est ainsi que BERTIN-SANS [2] observa sous l'action des acides des spectres dus à des mélanges d'hématine et de méthémoglobine.

En 1895, MENZIES [3] montre que les acides acétique, oxalique, phosphorique, chlorhydrique, nitrique et sulfurique agissent sur l'oxyhémoglobine en donnant d'abord de la méthémoglobine, puis de l'hématine. Le stade méthémoglobine se distingue du stade hématine par la position de la bande dans le rouge et par l'action des réducteurs. Avec les

[1] Haldane, Makgill et Mavrogordato, *loc. cit.*, p 174-175.
[2] Th. p. 102-103.
[3] On the action of certain acids on blood pigment. *J. of. Physiol.*, **17**, 415.

quantités « minimales » d'acide, la bande dans le rouge est à $\lambda = 630$ (Méthémoglobine), avec des quantités plus considérables, elle recule vers C [$\lambda = 642$ avec les acides acétique, oxalique et phosphorique, $\lambda = 650$ avec les autres acides minéraux].

En 1899, HARNACK[1] pense établir que la Méthémoglobine formée par les acides très dilués et même CO^2, diffère de la méthémoglobine ordinaire parce que la bande dans le rouge, au lieu de border C, est à cheval sur C. Et il en fait un composé spécial qu'il appelle **Acidhémoglobine**. Il ne cite pas le travail antérieur de MENZIES, ne détermine aucune longueur d'ondes, et ne donne qu'un simple schéma qui ne saurait entraîner la conviction. L'action du cyanure de potassium sur l'acidhémoglobine n'a rien de spécial, comme il le pense, et la bande qu'il a confondue avec celle de l'hémoglobine réduite est la bande de la cyanhémoglobine, formée par le peu d'acide cyanhydrique que met en liberté l'acidité de la solution. Il suffit d'ajouter quelques gouttes d'eau de laurier-cerise à une solution de méthémoglobine ordinaire pour l'obtenir. HARNACK reconnaît d'autre part que son *acidhémoglobine* est très instable et a une grande tendance à donner de l'hématine[2]. Comme nous avons vu que le passage de la méthémoglobine à l'hématine n'est pas total d'emblée, il se peut très bien que la soi-disant *acidhémoglobine* ne soit qu'un mélange de méthémoglobine et d'hématine, ce qui expliquerait que la bande dans le rouge apparaisse comme ayant une position intermédiaire entre celles des bandes des deux constituants[3]. Une expérience

[1] Ueber die Einwirkung des H^2S und der Säuren auf den Blutfarbstoff (*Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **26**, 558), p. 574.

[2] « Das Acidhämoglobin ist aber ungemein geneigt zu weiterer Zersetzung, wobei zunächst Hämatin auftritt » (*loc cit.* p. 585).

[3] On verra dans la troisième partie de cette thèse des phénomènes du même genre pour des mélanges de méthémoglobine et de méthémoglobine fluorée.

de Bertin-Sans[1] vient à l'appui de cette opinion : En mêlant une solution de méthémoglobine dont la bande (dans le rouge) couvrait les divisions du micromètre comprises entre 87 et 92, et une solution d'hématine dont la bande était à 85-91, il obtint une bande qui s'étendait de 83 à 90 et avait son milieu à 86. Or, d'après la planche II de la thèse Bertin-Sans, on voit que la division 86 correspond à la raie C de Frauenhofer. La solution de méthémoglobine présentait donc bien sa bande bordant C, et le mélange d'hématine et de méthémoglobine la bande à cheval sur C, donnée par Harnack comme caractéristique de l'*acidhémoglobine*. On comprend donc les réserves qu'ont faites certains auteurs (Lambling[2], Thierfelder[3]) en rendant compte du travail de Harnack, et on ne saurait partager l'empressement avec lequel d'autres (tels O. Cohnheim[4] et R. Kobert[5]), peut-être sous l'attrait d'un mot nouveau, ont admis l'*acidhémoglobine*.

Mais la question de l'action des acides sur la matière colorante du sang reste encore ouverte. Tout récemment, deux auteurs anglais, C. Ham et H. Balean[6], critiquant la méthode de distinction spectroscopique entre l'hématine et la méthémoglobine fondée sur l'emploi des réducteurs, et montrant que, dans l'action des acides sur le pigment sanguin, il ne peut être libéré que la moitié de l'oxygène que dégagerait le ferricyanure, concluent que la méthémoglobine n'est pas un produit intermédiaire dans la formation d'hématine par les acides à partir de l'oxyhémoglobine.

[1] Th., p. 103.

[2] Dict. Würtz. 2me suppl. 43e fasc., pp. 64 et 69 (1902).

[3] 6e édit. de F. Hoppe-Seyler's Handbuch der physiol. u. path. chem. Analyse (1903) p. 357.

[4] p. 247 de la 2e édit. de *Chemie der Eiweisskörper* (1904).

[5] Pflüger's Archiv. f. d. g. Physiol., **82**, 603 (1900).

[6] *The effects of acids upon Blood.* Journ. of. Physiol., **32**, 312 (mai 1905).

Ce qu'on a pris pour de la méthémoglobine ne serait que des mélanges d'hématine et d'oxyhémoglobine, quelle que soit la dilution de l'acide employé. Malgré la justesse de certaines critiques sur lesquelles je reviendrai à propos de la distinction de la méthémoglobine et de l'hématine, le mémoire de HAM et BALEAN ne me paraît pas devoir clore définitivement le débat. On pourrait aussi bien, avec les mêmes résultats spectroscopiques et gazométriques, avoir affaire à un mélange de méthémoglobine, d'hématine et d'oxyhémoglobine qu'à un mélange d'hématine et d'oxyhémoglobine seulement.

Action des alcalis

L'action méthémoglobinisante de faibles quantités de bases, signalée par BERTIN-SANS[1] et LAMBLING[2], n'a pas été le sujet d'étude approfondie. La plupart des auteurs pensent qu'il doit se faire facilement de l'hématine. O. COHNHEIM[3] fait jouer à la *cathémoglobine* de VAN KLAVEREN le même rôle intermédiaire dans l'action des alcalis qu'à l'acidhémoglobine dans l'action des acides. Mais cette *cathémoglobine* n'a encore été l'objet que de travaux contradictoires, « hématine neutre » pour ARNOLD[4], chromoprotéide contenant moins de fer que la méthémoglobine pour VAN KLAVEREN[5], son spectre présenterait deux bandes entre D et E pour les uns, rien dans le vert et une bande dans l'orangé pour les autres (ZIEMKE et MÜLLER[6]). La question réclame évidemment de nouvelles études.

[1] Th , p. 34.

[2] Encycl. Fremy, *loc. cit.*, p. 65.

[3] Chemie der Eiweisskörper, 2e édit. p. 248.

[4] Centralbl. f. die med. Wiss. **37**, 833 et 849 (1899); Zeitschr. f. physiol. Chem., **29**, 78.

[5] Zeitschr. f. phys. Chem., **33**, 293 (1901).

[6] E. Archiv. f. Physiol., **1901**, suppl. page 180.

Actions méthémoglobinisantes sur l'hémoglobine réduite et la carboxyhémoglobine

Dans tout ce qui précède il n'a été question que des actions méthémoglobinisantes sur l'oxyhémoglobine. La méthémoglobinisation de la carboxyhémoglobine et de l'hémoglobine réduite a fait l'objet de bien peu de travaux. Weyl et Anrep avaient montré [1] que la carboxyhémoglobine se méthémoglobinise beaucoup moins rapidement que l'oxyhémoglobine (1880). H. Bertin-Sans et J. Moitessier [2] prouvèrent qu'il s'agit bien de méthémoglobine ordinaire et non de carboxyméthémoglobine, — au moins sous l'action du ferricyanure.

V. Zeynek [3] dit avoir vérifié une expérience de Henninger sur laquelle on avait conservé quelques doutes et démontrant la méthémoglobinisation directe par le ferricyanure de l'hémoglobine réduite. Le permanganate agirait de même. Le nitrite de sodium serait sans action. Hammarsten [4] a fait observer que seuls les agents oxydants peuvent donner de la méthémoglobine à partir de l'hémoglobine réduite, et à l'abri de l'oxygène. J'ai déjà signalé que le Palladium hydrogéné ne peut donner de la méthémoglobine qu'à partir de l'oxyhémoglobine.

J'ai hydrogéné fortement une lame de Palladium et l'ai plongée dans une solution d'oxyhémoglobine contenue dans un tube à essais. Celui-ci était hermétiquement bouché et muni d'un petit tube à dégagement plongeant dans l'eau distillée bouillie. Le dégagement de l'hydrogène balaie tout l'oxygène, y compris celui de

[1] Les méthémoglobinisants employés étaient MnO^4K, ClO^3K, I+IK.

[2] C. R. **113**, 210, (1891).

[3] Engelmann's Archiv. f. Physiol. **1899**, 490.

[4] *Lehrb. d. physiol. Chem.* 5e édit., Wiesbaden, 1904, p. 171.

l'oxyhémoglobine et la solution ne présente plus que la bande de Stokes. Quand le dégagement a cessé, on ferme à la lampe. Le Palladium ne contient plus alors que l'hydrogène méthémoglobinisant. Plusieurs tubes conservés ainsi plusieurs mois n'ont jamais donné au spectroscope que la bande de Stokes.

Il conviendrait, comme le dit LAMBLING [1], de refaire pour chaque agent méthémoglobinisant cette étude parallèle de son action sur l'oxyhémoglobine et sur l'hémoglobine réduite.

c. — Agents biologiques

J'examinerai sous cette rubrique les faits concernant l'action des microbes et de certaines conditions physiologiques.

Action des microbes

HOPPE-SEYLER (1865) avait déjà indiqué l'action méthémoglobinisante de la putréfaction. M. LABBÉ [2] étudia l'action de différents microbes sur le pigment sanguin. Les cultures étaient faites sur du sang défibriné aseptique, et les modifications étaient observées au spectroscope à travers le tube de culture. On pourrait ainsi distinguer trois catégories principales de microbes : 1° ceux qui donnent rapidement et constamment de la méthémoglobine, comme le bacille de la diphtérie ; 2° ceux qui sont très réducteurs et ne donnent que tardivement de la méthémoglobine (*B. coli*, *Eberth*, *pyocyanique*, *proteus*, *staphylocoque*, *vibrion cholérique*) ; 3° ceux qui jouissent de propriétés intermédiaires, sont moins

[1] 2e suppl. du Dict. de Würtz, article Hémoglobine, p. 67.
[2] Archives de méd. expérimentale, **15**, 364, (1903).

réducteurs et moins méthémoglobinisants que ceux du deuxième groupe (*bactéridie charbonneuse*, *tétragène*, *subtilis*).

L'action méthémoglobinisante des microbes est-elle due à leurs toxines ? Pour M. Labbé, les toxines agiraient dans le même sens que les microbes correspondants, mais d'une façon moins intense. Cependant la toxine diphtérique ne serait pas méthémoglobinisante alors que, selon M. Labbé, le bacille de Löffler est un « puissant producteur de méthémoglobine ». Cette discordance entre le bacille de la diphtérie et sa toxine amène à penser que l'action méthémoglobinisante des microbes est plus complexe, qu'elle est sans doute aussi en relation avec leurs propriétés fermentatives vis à-vis des hydrates de carbone ou des graisses du sang ; fermentations d'où résultent des *acides*. Ces propriétés sont en effet très accusées pour le bacille de Löffler, tandis que la diphtérotoxine résulte, comme on sait[1], de la filtration d'une culture sur bouillon lorsque celui-ci est devenu *alcalin*. Ce qui peut expliquer les différences d'action sur l'apparition de la bande dans le rouge. Il se pose donc ici le même problème que pour les acides sur la part que prend l'hématine dans la formation de cette bande. L'action protéolytique des microbes est encore une raison de plus pour se mettre en garde contre l'intervention d'hématine. M. Labbé a d'ailleurs noté la présence de l'hématine dans ses tubes de culture au bout d'un certain temps.

Action du laquage

Jusqu'ici cette revue critique n'a considéré que la méthémoglobinisation de la matière colorante du sang à l'état soit de sang dilué, soit de solutions de cristaux d'oxyhémoglo-

[1] Cf. Courmont. Précis de bactériologie, 2e édit., p. 824.

bine, c'est à-dire séparée de son support physiologique, le globule rouge.

Il résulte des travaux de v. Mering et de Hayem (cf. Thèse Bertin-Sans) que le pigment du globule rouge résiste mieux aux agents méthémoglobinisants que l'oxyhémoglobine libérée du complexe globulaire. On connaît à ce point de vue la classification de Hayem [1] et les lois qu'il en a déduites sur la formation de la méthémoglobine dans l'organisme.

On a voulu interpréter ces faits en faveur de l'hypothèse de Hoppe-Seyler, que la matière colorante du globule diffère chimiquement de l'oxyhémoglobine qui en dérive. Hoppe-Seyler indique en effet, dans son traité classique, que les pigments sanguins existent sans doute dans l'hématie à l'état de combinaison avec d'autres substances du stroma, avec de la lécithine ou de la cholestérine : il désigne ces combinaisons sous le nom d'*artérine* pour le pigment du sang artériel, et de *phlébine* pour le pigment du sang veineux. On a donc pensé [2] que, lorsque sous l'influence de certains méthémoglobinisants (ceux de la 1re classe de Hayem), il se fait de la *méthémoglobine intraglobulaire*, on n'a pas affaire à de la méthémoglobine ordinaire, mais à de la *Metphlébine*. On expliquerait ainsi les observations de Hayem : cette *metphlébine* ferait plus facilement retour à l'*artérine* ou à la *phlébine* que la méthémoglobine, à l'oxyhémoglobine ou à l'hémoglobine.

Ces différences entre les pigments globulaires et les pigments extraglobulaires ressortiraient encore de leur action comparée sur l'eau oxygénée [3]. L'*artérine* décomposerait énergiquement H^2O^2, tandis que l'oxyhémoglobine n'aurait

[1] Hayem. Du Sang. Paris, 1889, pp. 366-369.

[2] Kobert. Pflüger's Archiv. f. Physiol., **82**, 603 (1900).

[3] Alex. Schmidt. Cf. Henninger. Soc. Biol., nov. 1882, et Hayem, *loc. cit.*, p. 358.

qu'une action presque nulle. Mais cette manière de voir ne peut plus être soutenue depuis que mon maître, le professeur Ville[1], a montré, avec M. J. Moitessier, que cette action catalytique des globules rouges est due à un principe diastasique isolable et indépendant de la matière colorante.

Cette découverte amène à penser que les différences constatées au point de vue de la méthémoglobinisation ne tiennent sans doute ni à une combinaison chimique du pigment avec le stroma, ni seulement à la pénétrabilité élective de ce stroma[2] et à ses modifications physiques. Ces conceptions résultent de l'idée trop simpliste que l'on tend à se faire parfois du globule rouge, — sur la cytologie duquel nous sommes si mal renseignés[3]. Il est probable, en effet, que l'hématie des mammifères n'est pas un simple disque sanguin, une concrétion hémoglobique ou une vésicule sans organisation. Elle offre des vestiges de constitution cellulaire et, malgré sa transformation profonde par le fait d'une spécialisation étroite, elle a la valeur d'une cellule[4]. Et comme telle elle doit posséder, suivant la métaphore de Duclaux, son cortège de serviteurs diastasiques — dont l'un a été isolé par MM. J. Ville et Moitessier, — et qui doivent concourir à maintenir le ferment le plus important — le pigment respiratoire — dans la forme instable qui convient le mieux à sa fonction. C'est cette atmosphère de vie où se trouve le pigment sanguin dans le globule rouge qui explique les différences de se comporter de l'hématie et de l'oxyhémoglobine vis-à-vis des agents méthémoglobinisants, et pourquoi la libération de l'oxyhémoglobine du complexe

[1] J. Ville et J. Moitessier, Soc. Biol. **55**, 1126 (25 juillet 1903).

[2] Dittrich. Arch. f. exp. Path. u. Pharmak, **29**, 262 (1891).

[3] Cf. Laguesse. Revue annuelle d'Anatomie, *in* Rev. gén. des Sciences, 30 déc, 1905, p. 1099.

[4] Prenant, Bouin et Maillard. Traité d'Histologie, **1**, p. 563 (1904).

globulaire est une condition propice à la méthémoglobinisation. — A propos de la bande que l'on voit dans le rouge avec les tubes longs, j'aurai à examiner la question de savoir si le laquage peut être à lui seul un agent méthémoglobinisant.

B. — PRÉPARATION DE LA MÉTHÉMOGLOBINE CRISTALLISÉE

1° *Par l'alcool et le froid.* — La plupart des auteurs se servent du ferricyanure comme agent méthémoglobinisant et de l'alcool et du froid pour amener la cristallisation suivant le procédé indiqué par Hüfner et Otto (1882), Hüfner (1884), Jæderholm (1884). Voici comment opère R. v. Zeynek [1]. On part de l'oxyhémoglobine (de cheval, de chien ou de porc) purifiée par deux ou trois cristallisations. On en fait une solution, *aussi concentrée que possible.* On y ajoute peu à peu du ferricyanure de K en solution à 10 °/₀ jusqu'à ce que la couleur primitive ait complètement viré au brun sombre. Finalement on verse un léger excès de ferricyanure pour être sûr qu'il ne reste pas un peu d'oxyhémoglobine non transformée. La solution est alors, suivant le procédé classique pour l'oxyhémoglobine, refroidie à 0°, additionnée du quart de son volume d'alcool à 90°, également refroidi à 0° et abandonnée dans la glace ou mieux dans un mélange réfrigérant. Après quelques jours, il se fait un dépôt abondant de petits cristaux très fins, de couleur brun fauve, qui, mis en suspension dans le liquide remué, y produisent des ondes soyeuses et mordorées.

[1] *Engelmann's Archiv. f. Physiol.*, **1899**, 461. — C'est ce procédé qu'emploient encore récemment Hüfner et Reinbold (même Archiv., **1904**, suppl. 391).

Cette méthode ne réussit bien qu'en partant de solutions d'oxyhémoglobine très concentrées [1] et en prolongeant suffisamment l'action du froid. Dans quelques cas où ces conditions étaient les mieux remplies, von Zeynek a pu obtenir des cristaux de méthémoglobine de cheval, sans addition d'alcool.

Les cristaux sont en général de fines aiguilles prismatiques. Dans un cas, et avec la méthémoglobine de cheval, v. Zeynek a obtenu des tablettes hexagonales macroscopiques. J'ai pu l'hiver dernier, parmi les nombreuses préparations que je fis avec le professeur Ville, observer quelquefois ces cristaux. Ce sont des hexagones réguliers pouvant atteindre jusqu'à 1/2 centimètre de diamètre. Ils paraissent se former de préférence dans les solutions peu concentrées et qui ne subissent l'action du froid que progressivement. Le dépôt cristallin est dans ce cas peu abondant et l'on voit alors des hexagones collés çà et là aux parois du vase. Examinés au microscope, ils subissent rapidement les phénomènes d'érosion dessinés par Uhlik [2].

2° *Par le sulfate ammonique.* — L'alcool qui, dans le procédé précédent, favorise la cristallisation en tendant à diminuer la solubilité de la méthémoglobine, peut être remplacé par le sulfate ammonique qui joue le même rôle.

Le sulfate ammonique à saturation précipite les substances protéiques. A des concentrations voisines de la demi-saturation, il favorise leur obtention à l'état cristallisé, comme

[1] Il est souvent difficile d'obtenir de telles solutions à partir d'oxyhémoglobine cristallisée. Il serait à essayer de préparer la méthémogl. cristal. par méthémoglobinisation directe des extraits obtenus par laquage mécanique d'hématies lavées en suivant ensuite le procédé indiqué par Schuumans-Stekhoven pour l'oxyhémogl. (Cf. Zeitschr. f. physiol. Chem., **33**, p. 296)

[2] Pflüger's Arch. f. Physiol., **104**, 64 (1904).

l'a montré d'abord Hofmeister (1889) pour l'ovalbumine et la sérumalbumine, Molisch (1894) pour la phycoérythrine, F.-N. Schulz (1898) pour l'oxyhémoglobine, M. Henze (1901) pour l'hémocyanine [1].

C'est pourtant indépendamment de ces considérations que Dittrich [2] fut amené, empiriquement, à préparer de la méthémoglobine cristallisée par le sulfate ammonique. Cet auteur n'ajoute aucun méthémoglobinisant; son procédé revient en somme à la préparation d'oxyhémoglobine dont la méthémoglobinisation spontanée est hâtée par la présence de sulfate ammonique : à une purée d'hématies laquées par l'éther et filtrée, il ajoute deux fois son volume d'une solution saturée à froid de sulfate d'ammonium, filtre et abandonne au froid dans des capsules plates. La cristallisation commence ordinairement après 24 heures. Il faut par plusieurs cristallisations purifier les cristaux d'un précipité amorphe qui s'y mêle souvent. Les cristaux sont d'abord constitués par de l'oxyhémoglobine, mais l'exposition à l'air et les recristallisations les méthémoglobinisent peu à peu complètement.

On arrive au même résultat par le procédé mieux réglementé indiqué par Schulz [3] pour l'oxyhémoglobine ; on abandonne au repos et au frais, dans une ampoule à décantation du sang de cheval oxalaté (1,5 °/₀₀ d'oxalate ammonique). On recueille la purée de globules tombée au fond du vase et on la laque avec le double de son volume d'eau. Cette solution, refroidie à 0°, est additionnée de son volume d'une solution, également refroidie à 0°, de sulfate ammonique saturée. La globuline, le fibrinogène et les stromas

[1] Pour les indications bibliograph. Cf. Cohnheim, *Chemie der Eiweisskörper*, 2e édit.. Braunschweig, 1904 p. 149.

[2] Arch. f. experim. Path. u. Pharmak. **29**. 250 (1891).

[3] Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**, 449 (1898). Cf. *Armand Gautier et J. Albahary*, 120 Exercices de chimie pratique. Paris, 1899, Masson, édit.. p. 181.

sont ainsi précipités. Le filtratum abandonné *à la température ordinaire* donne de l'oxyhémoglobine cristallisée et pure. On la prive de ses eaux-mères, on la redissout dans l'eau et par addition d'une solution de sulfate ammonique refroidie, on provoque une deuxième cristallisation de l'hémoglobine. Nous avons souvent, le professeur VILLE et moi, éprouvé cette méthode pour les besoins du cours. Elle est commode et réussit toujours. On obtient ainsi avec le sang de cheval de belles tablettes losangiques visibles à la loupe. La dessiccation sur plaques poreuses hâte la méthémoglobinisation, tout en permettant de séparer mécaniquement une partie du sulfate ammonique dont les cristaux restent imprégnés et qui sort en efflorescences.

Au bout d'un certain temps les cristaux d'oxyhémoglobine ainsi préparés sont devenus des cristaux de méthémoglobine.

D'ailleurs les cristaux d'oxyhémoglobine préparés par la classique méthode d'HOPPE-SEYLER sont, eux aussi, au bout d'un temps suffisant complètement transformés en méthémoglobine et peuvent servir comme telle dans les recherches[1].

Pour réaliser une méthémoglobinisation totale et rapide, voici comment, avec M. le professeur VILLE, nous avons appliqué le procédé de SCHULZ à l'obtention de la méthémoglobine cristallisée : A la solution d'hématies on ajoute goutte à goutte en agitant une solution concentrée de ferricyanure de potassium jusqu'à méthémoglobinisation complète. On en est averti par la coloration de la mousse qui

[1] Notamment Hüfner et Reinbold (Engelm. Archiv. f. Physiol. **1904**, supp. Bd. p. 392) ont employé dans leurs recherches absorptiométriques avec le bioxyde d'Azote, comme méthémoglobine des « *cristaux d'oxyhémoglobine conservés à sec depuis plusieurs mois et complètement et spontanément méthémoglobinisés* ».

devient alors brune, et on s'en assure au spectroscope en utilisant la réaction que j'indiquerai dans la 3e partie de cette thèse [1]. C'est cette solution méthémoglobinisée qui est alors traitée suivant les indications de SCHULZ. Les cristaux finalement obtenus peuvent être lavés à la trompe avec une solution demi-saturée de sulfate ammonique pour se débarrasser du ferrocyanure [2]. Il est plus difficile de se débarrasser du sulfate ammonique. Le lavage à 0° avec de l'eau distillée, alcoolisée, le brossage des plaques cristallines desséchées sur terre poreuse n'en enlèvent jamais qu'une partie.

*
* *

La méthémoglobine peut donc s'obtenir cristallisée :

1° *par simple refroidissement si ses solutions sont assez concentrées* (v. ZEYNEK);

2° *par l'alcool et le froid* (HÜFNER et ses collaborateurs).

3° *par le sulfate ammonique* (DITTRICH, VILLE et DERRIEN).

4° *Enfin les anciennes préparations d'oxyhémoglobine peuvent servir comme méthémoglobine cristallisée.*

*
* *

On voit donc combien est gratuite l'assertion récente de MM. PIETTRE et VILA que « *la méthémoglobine ne peut être préparée à l'état cristallisé* » (C. R., **140**, p 1351, 15 mai 1905).

[1] Quand la mousse est devenue brune, on met 10 gouttes du mélange dans 10cc. d'eau distillée en un tube à essais, on agite avec une pincée de NaF en poudre et on place le tube à essais devant la fente du spectroscope. Si deux bandes d'absorption persistent dans le vert, il faut ajouter encore un peu de ferricyanure. On recommence l'essai spectroscopique et on ajoute du ferricyanure jusqu'à ce qu'après addition de NaF à la prise d'essais il n'y ait plus de bandes d'absorption dans le vert. On arrive ainsi à une méthémoglobinisation complète sans employer trop de ferricyanure.

[2] Il faut priver les cristaux de méthémoglobine de tout ferri ou ferrocyanure, sans quoi il se ferait, sous l'influence de la lumière, de la cyanhémoglobine.

C. — INDICATIONS COMPLÉMENTAIRES SUR LES PROPRIÉTÉS DE LA MÉTHÉMOGLOBINE

SES SPECTRES ET SES COMPOSÉS

Comme les hémoglobines dont elles dérivent, *les méthémoglobines* diffèrent un peu d'un animal à l'autre. Les procédés de préparation, qui viennent d'être exposés, pourraient même faire penser que l'on peut obtenir plusieurs méthémoglobines à partir de l'hémoglobine d'un même animal. En effet, nous avons obtenu, on l'a vu, à partir de l'oxyhémoglobine de cheval, par l'alcool et par le froid, tantôt de fines aiguilles prismatiques, tantôt de larges tablettes hexagonales, et, par le sulfate ammonique, des plaquettes losangiques. S'agit-il d'un simple polymorphisme? Les trois sortes de cristaux donnent bien, en dissolution dans du carbonate de sodium au millième, les mêmes constantes spectrophotométriques[1]. Mais cela ne les rapproche pas autrement que les méthémoglobines des différents animaux, que l'on admet n'être pas identiques bien qu'elles présentent les mêmes propriétés spectrales et spectrophotométriques. On voit donc quelle est la complexité de l'étude réellement chimique des pigments sanguins, et l'on n'en sera point surpris si l'on n'oublie pas, qu'à part le radical hématinogène (qui d'après Cazeneuve varierait aussi suivant les animaux, mais dont l'Ecole russe commence à éclaircir la constitution), le reste de leur énorme molécule est de

[1] V. Zeynek a déterminé ces constantes pour les deux premières sortes de cristaux, nous avons été amenés, M. le professeur Ville et moi, dans un travail en cours, à faire les mêmes déterminations sur des solutions de cristaux au sulfate ammonique. Nos valeurs de ε'/ε concordent très bien avec celles de v. Zeynek.

nature *protéique*. On entend donc par « la méthémoglobine » une entité qui présente les propriétés physico chimiques communes aux différentes méthémoglobines.

Les travaux récents ont peu ajouté aux propriétés déjà connues. Pour être plus bref et ne pas faire de double emploi, je renverrai pour leur étude, non seulement à l'excellent chapitre correspondant de la thèse de Bertin-Sans mais aussi, pour ce qui y a été ajouté depuis, à l'exposé clair, concis et complet qu'en a donné, en 1902, Lambling (*article Hémoglobine. 2e suppl. Dict. Würtz, pp. 67 à 71*). On ne trouvera donc ici qu'un léger addendum et quelques réflexions.

Propriétés physiques autres que les propriétés spectrales

On donne des coefficients de solubilité de la méthémoglobine dans l'eau, mais on ne dit généralement pas que, comme l'oxyhémoglobine, elle est, aussi, soluble dans la *glycérine*.

A Gamgee [1] a montré qu'à l'opposé de l'hématine, qui est fortement magnétique, la méthémoglobine est comme l'oxyhémoglobine un corps très *diamagnétique*.

Puisque du côté chimique nous sommes arrêtés par la complexité albuminoïde de la molécule, c'est en poursuivant l'étude de ces propriétés physiques, qui de prime-abord semblent plus curieuses qu'intéressantes, que l'on arrivera à mieux pénétrer la méthémoglobine. Ainsi, il serait intéressant de connaître son *pouvoir rotatoire*. A. Gamgee et Croft-Hill [2] ont, en effet, montré que contrairement à l'opinion générale qui semblait faire de toutes les substances protéiques des corps lévogyres, l'oxyhémoglobine est nettement dextrogyre ($[\alpha]$ c = + 10°,4). L'histone, qui résulte du dédoublement de l'oxyhémoglobine, comme de celui de la méthémoglobine d'ailleurs, et n'est autre que la globine, a un pouvoir rotatoire gauche ($[\alpha]$ c = — 54°,2). Si donc, comme l'ont pensé certains auteurs, la méthémoglobine n'était qu'un mélange d'hématine et de globine,

[1] The Lancet, **1901**, II, 590.

[2] Deutsch. chemisch. Gesellsch., **36**, 913 (1903).

son pouvoir rotatoire l'indiquerait par comparaison avec ceux de l'hématine et de la globine.

Propriétés chimiques

La plus importante reste toujours la non-désoxygénation de la méthémoglobine par le vide.

L. Liebermann[1], en étudiant le bleuissement de la teinture de gaïac par le sang, attribue la réaction à la méthémoglobine formée par l'action de l'essence de térébenthine sur l'oxyhémoglobine. Mais J. Moitessier[2] obtint la même réaction avec l'hématine. Pour G. Bertrand[3], l'hémoglobine, (la méthémoglobine) ou l'hématine joueraient dans ces réactions le rôle de peroxydases.

*
* *

Il est curieux de remarquer que les deux états sous lesquels se présente la méthémoglobine sont séparément incomplètement caractérisés.

La *méthémoglobine alcaline* a un spectre sur lequel on ne discute plus et dont les constantes spectrophotométriques démontrent bien qu'on a affaire à une matière colorante bien définie et non à un mélange. Mais on n'a pu l'obtenir à l'état cristallisé. D'après v. Zeyneck[4] « on n'a jamais pu jusqu'à présent faire cristalliser une solution alcaline de pigments sanguins ». D'autre part, la *méthémoglobine dite acide* s'obtient, ainsi que nous l'avons vu, à l'état cristallin aussi bien que l'oxyhémoglobine. Mais son spectre est l'objet de discussions encore pendantes.

[1] Pflügers Archiv f. Physiol., **104**, 227-232 (1904).
[2] C. R. Soc. Biol., **57**, 373 (1904).
[3] Bullet. Institut Pasteur, **3**, 36 (1905).
[4] Zeitschr. f. physiol. Chem., **33**, 434 (1901).

Les controverses sur la nature des absorptions comprises entre D et E dans le spectre de la méthémoglobine acide

Je ne redirai pas tous les arguments ingénieux qui ont été invoqués pour ou contre la nature étrangère de ces deux ombres, plus ou moins floues, qui apparaissent ou disparaissent, suivant les auteurs, dans la région verte du spectre de la méthémoglobine acide. Elles couvrent sensiblement les plages qu'absorbent les solutions étendues d'oxyhémoglobine. D'où la discussion. Dans certains cas, d'après les dessins donnés, il doit certainement y avoir un peu d'oxyhémoglobine qui les renforce. Dans le cas de l'emploi des *nitrites* comme agents méthémoglobinisants, on a vu qu'elles étaient dues à l'azoxyhémoglobine. En opérant avec le ferricyanure, ce sont plutôt des ombres estompées que de véritables bandes. Parmi les nombreuses images données, je crois que c'est la fig. 67 (p. 361 du Traité du sang, 1889) de Hayem, qui se rapproche encore le plus de ce que l'on voit d'habitude. Dans d'autres, plus récentes et plus luxueuses, la beauté des couleurs n'a d'égale que l'inexactitude des absorptions. M. le professeur H. Bertin-Sans a bien voulu me communiquer son opinion actuelle sur la nature des deux bandes intermédiaires du spectre de la méthémoglobine dite acide. On se rappelle que sa thèse apporta de solides arguments contre la manière de voir qui attribue ces absorptions à un reste d'oxyhémoglobine non transformée [1]. Le professeur H. Bertin-Sans est encore persuadé qu'elles ne sont point dues à l'oxyhémoglobine, et qu'elles sont bien produites par la *méthémoglobine*, mais par la *méthémoglobine* alcaline.

[1] On verra dans la troisième partie de cette thèse que l'étude comparée de l'action de NaF sur l'oxyhémoglobine et sur la méthémoglobine conduit à un nouvel argument contre cette manière de voir (Ville et Derrien).

Je crois que cette opinion contient une grande part de vérité. Plusieurs observations parlent en sa faveur :

1° J'ai constaté qu'en ajoutant goutte à goutte une solution *très étendue* de soude à une solution de méthémoglobine présentant le spectre dit acide, on peut, en surveillant l'effet de chaque addition au spectroscope, obtenir un liquide qui présente à la fois et très nettement les spectres superposés de la méthémoglobine acide et de la méthémoglobine alcaline. La bande à $\lambda = 603$ étant alors aussi nette que la bande à $\lambda = 634$. En suivant le phénomène, bien avant l'apparition de l'absorption à $\lambda = 603$, qui est la plus faible des trois bandes du spectre alcalin, on constate simplement le renforcement progressif des deux bandes intermédiaires du spectre acide (examen sous 15^{mm}).

2° J'avais remarqué qu'en méthémoglobinisant par un excès de ferricyanure des dilutions sanguines de différents animaux, les bandes intermédiaires du spectre étaient plus ou moins foncées suivant les animaux. Ceci s'explique très bien dans la manière de voir actuelle du professeur Bertin-Sans. J'ai, en effet, choisi un animal, l'anguille, dont le sang est donné par Drouin comme le moins alcalin (alcalinité traces indosables) : or, le sang d'anguille donne une méthémoglobine, très altérable d'ailleurs, mais qui ne présente presque pas d'absorption dans le vert (examen fait sous 15^{mm}).

3° L'addition ménagée d'acide acétique dilué atténue les absorptions du vert.

4° Les mesures des milieux de ces absorptions dans le spectre alcalin et dans le spectre dit acide sont presque les mêmes. Bertin-Sans donne les $\lambda\lambda$:

580 et 538,5 pour la méthémo-acide
578,5 et 538,5 pour la méthémo-alcaline

Il est donc probable que la présence simultanée de plus ou moins de méthémoglobine alcaline dans les solutions brunes de méthémoglobine doive expliquer bien des contradictions. Et l'on comprend pourquoi ces contradictions s'effacent pour les solutions rouges (faites dans le carbonate

sodique au millième) où l'on n'a plus que de la méthémoglobine alcaline spectrophotométriquement caractérisée.

Quant à savoir si la modification brune pure possède réellement, dans le vert, deux absorptions qui lui soient propres, ce sera très difficile. Car si l'on ajoute un peu trop d'acide pour se débarrasser de la modification rouge, il se fera de l'hématine dont le spectre présente aussi deux absorptions dans le vert.

Il n'y a donc, dans le spectre de la méthémoglobine acide, que les deux bandes extrêmes sur lesquelles tous les auteurs soient d'accord. Celle du rouge a son milieu vers $\lambda = 633$ ou $\lambda = 634$ (Jæderholm, Bertin-Sans, Formanek [1], Ville et Derrien) vers $\lambda = 632$ (Dittrich) entre $\lambda = 648$ et $\lambda = 629$ (Araki) entre $\lambda = 652$ et $\lambda = 630$ (Kobert et Wachsmuth [2].) Pour Menzies [3], sa position est variable, parce qu'il range parmi les agents méthémoglobinisants, comme nous le verrons, le fluorure de sodium. La bande qui se trouve entre *b* et F a, comme le reconnaît Menzies, une position plus difficile à mesurer. On donne en général pour son milieu $\lambda = 500$ (Jæderholm, Bertin-Sans, Ville et Derrien) $\lambda = 500,8$ (Formanek) $\lambda = 502$ (Ziemke et Müller [4]).

Gamgee [5] a poursuivi l'étude des absorptions dans l'*ultra-violet* : Comme l'hématine, la méthémoglobine posséderait une bande large et intense entre *h* et L. (Les solutions diluées n'absorberaient qu'entre K et H ; quand la concentration augmente, la région absorbée pourrait aller jusqu'à M et finalement comprendre tout l'ultra-violet.)

*
* *

MM. H. Bertin-Sans et J. Moitessier [6] ont, devant la fente du spectroscope, refait de la méthémoglobine en partant de

[1] Jahresb. Tierchem., **31**, 223 (1901).
[2] Pflügers Arch. f. Physiol., **82**, 603 (1900).
[3] Journ. of. Physiology, **17**, 402 (1895) (conclusion n° 7).
[4] Engelm. Archiv f. Physiol., **1901**. Suppl. p. 117.
[5] Zeitschr. f. Biolog., **34**, 505 (1896) (nach. O. Cohnheim. Chemie der Eiw.)
[6] Voir C. R. 11 avril 1892. — *Bul. Soc. chim.* 20 mai 1892 et id. 5 mai 1893.

l'hématine et d'une matière albuminoïde. La neutralisation *très lente* d'une solution acide mixte des deux constituants les recombine, et la bande dans le rouge prend alors la position $\lambda = 633$. On peut facilement passer à la méthémoglobine alcaline, et par les réducteurs à l'hémoglobine réduite et à l'oxyhémoglobine. La matière albuminoïde employée était soit le mélange provenant de la coagulation (par l'éther ou par l'alcool tartrique) du sang défibriné, soit la globine. Si, au lieu de solutions acides d'hématine et de matière albuminoïde, on emploie une solution alcaline d'hématine et une solution acide de matière albuminoïde, en ajoutant l'une à l'autre, on peut obtenir directement soit la méthémoglobine alcaline, soit la méthémoglobine acide.

Cette *facilité de rénovation* d'un produit biologique, — si elle est du plus haut intérêt pour comprendre la souplesse que les complexes protéiques introduisent dans les réactions d'assimilation et de désassimilation — apporte, comme nous allons le voir, un certain trouble parmi les caractères classiques qui servaient à distinguer la méthémoglobine de l'hématine.

Distinction entre l'hématine et la méthémoglobine

On ne peut utiliser les différences qui existent entre les spectres alcalins de ces deux substances que si elles sont en solution pure. En présence d'un excès d'oxyhémoglobine, les différences ne sont plus tranchantes. En présence de substances albuminoïdes, la synthèse de méthémoglobine empêche de conclure. Ce sont ces considérations qui amenèrent Menzies[1] à penser que, dans l'état de nos connaissances, on ne peut distinguer l'hématine de la méthémoglobine que par

[1] *Loc. cit.* (conclusion 4).

l'action des réducteurs. La méthémoglobine donne alors de l'hémoglobine réduite et l'hématine de l'hémochromogène. La réaction pour l'hématine est surtout nette en présence de corps à fonction amine (Bertin-Sans et Moitessier) : les matières albuminoïdes, au lieu de gêner, deviennent donc des auxiliaires.

Menzies[1] avait pu cependant, lui-même, obtenir à partir de l'hémochromogène et de la globine, et sous l'influence du sulfure ammonique, de l'hémoglobine réduite.

Ham et Balean[2] attirèrent récemment l'attention sur ce fait, et montrèrent que l'hémochromogène fait ainsi retour à l'hémoglobine réduite, plus facilement qu'on ne le pensait. C'est ainsi qu'on peut aisément confondre, en présence d'un excès d'oxyhémoglobine, la bande dans le rouge que donne l'hématine avec celle de la méthémoglobine. Après addition de sulfure ammonique, on ne verra, si l'on n'y prend garde, que la bande de Stokes et l'on conclura à la présence de méthémoglobine (c'est ce qui est arrivé pour l'étude de l'action des acides sur le sang, et probablement aussi pour l'étude de l'action des microbes). Au contraire, si, pendant que l'expérimentateur observe au spectroscope, un aide verse, avec précautions, le réducteur au-dessus du liquide à analyser de façon à ce que les couches ne se mélangent pas, on verra apparaître dans la bande de Stokes et vers son bord droit, une absorption étroite et sombre due à l'hémochromogène, — s'il y avait un peu d'hématine. En opérant sans ces précautions, l'hématine passait inaperçue, l'hémochromogène redonnant très vite de l'hémoglobine réduite en présence de matières albuminoïdes.

Mais on ne peut trancher, par cette réaction qui décèle de

[1] Journ. of Physiolog. **57**, 415 (conclusion 3).

[2] Ham et Balean. J. of Physiolog. **32**, 312 (Mai 1905).

faibles quantités d'hématine, la question de savoir si une bande dans le rouge, en présence d'un excès d'oxyhémoglobine n'est pas due à un mélange de méthémoglobine et d'hématine : la méthémoglobine donnant comme l'oxyhémoglobine la bande Stokes. C'est pourquoi je n'ai pu admettre la conclusion de Ham et Balean excluant la méthémoglobine des produits de l'action des acides sur le sang.

Dérivés de la Méthémoglobine

Ces substances, appelées quelquefois composés de la méthémoglobine, pour l'étude desquelles je renvoie à l'article de Lambling, devraient être groupées, comme le fait d'ailleurs cet auteur, sous le nom préférable de *dérivés de la méthémoglobine*. Le fait qu'on les obtient à partir de la méthémoglobine ne veut pas dire, en effet, qu'elles conservent dans leur structure ce qui distingue la méthémoglobine de l'oxyhémoglobine ou de l'hémoglobine. C'est ainsi que v. Zeynek[1], qui a fait de l'une d'elles, la *cyanométhémoglobine* de Kobert, une étude complète, pense qu'il vaut mieux l'appeler *cyanhémoglobine*. Il l'a obtenue à l'état cristallisé, a pu y doser le cyanogène, a déterminé ses constantes spectrophotométriques, et a montré, en effet, l'identité du produit obtenu en faisant agir l'acide prussique sur la méthémoglobine, avec le composé formé par l'hémoglobine et le cyanogène. D'autre part NO agit sur la méthémoglobine sans donner d'azoxyméthémoglobine : il se fait, comme avec l'hémoglobine, de l'hémoglobine bioxyazotée (Hüfner et Külz [2]).

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 426 (1901).

[2] Hüfner et Reinbold ont déterminé que la méthémoglobine fixe un volume de bioxyde d'azote double du volume d'oxyde de carbone que fixe un poids égal d'hémoglobine. (Engelmann's Arch. f. Physiol. **1904**, suppl. 391).

Mais cela n'exclut point la possibilité de composés spéciaux à la méthémoglobine. C'est ainsi que KOBERT[1] a décrit sous le nom de « Wasserstoffsuperoxydmethämoglobin » (ou H^2O^2-*Méthémoglobine*) une combinaison instable de méthémoglobine et d'eau oxygénée. Les dilutions sanguines méthémoglobinisées par le ferricyanure deviennent roses sous l'action de H^2O^2 très étendu. Il ne se dégage pas de gaz, et la solution présenterait les absorptions caractéristiques suivantes : $\lambda = 600\text{-}584$, $\lambda' = 558\text{-}545$, $\lambda'' = 513\text{-}500$ (sang de bœuf à 2 °/₀ examiné sous 1^{cm}). La transformation de la méthémoglobine en H^2O^2-méthémoglobine serait si nette que KOBERT la propose comme réaction aussi bien de l'eau oxygénée que de la méthémoglobine. Il est probable que la *méthémoglobine fluorée*, dont il est question dans la troisième partie de cette thèse, rentre dans le même groupe. Il est alors intéressant de constater que la méthémoglobine, par les spectres caractéristiques que donnent les modifications de son énorme molécule sous l'influence de corps à molécules très légères comme CNH, H^2O^2, NaF, devient un réactif très sensible de ceux-ci. Une autre conclusion, qui se dégage de l'étude des dérivés de la méthémoglobine, c'est l'étroite parenté qui doit exister entre elle et l'hémoglobine, puisque le plus souvent leurs dérivés sont identiques.

D. — TENTATIVES THÉORIQUES POUR EXPLIQUER LA CONSTITUTION DE LA MÉTHÉMOGLOBINE

Depuis que HÜFNER et ses collaborateurs ont établi que la méthémoglobine contient autant d'oxygène que l'oxyhémoglobine, la longue et stérile controverse, sur la question de savoir si la méthémoglobine était un peroxyde ou un sous-

[1] Pflüger's Arch. f. Physiol. (1900), **82**, p. 612.

oxyde d'hémoglobine, ne s'est plus rouverte. L'action des réducteurs sur le spectre de la méthémoglobine faisait tous les frais de la discussion.

Haldane [1] a montré comment la formation intermédiaire d'oxyhémoglobine était due à l'oxygène dissous dans les liquides en expériences. Comme le dit Lambling [2], cette expérience de Haldane explique bien des contradictions.

A. v. Vorkampff-Laue [3] a essayé de réconcilier rétrospectivement les anciens adversaires, en supposant tout simplement qu'il y aurait deux sortes de méthémoglobine, ayant toutes deux les mêmes spectres : l'« oxydative » et la « réductive », suivant que l'agent méthémoglobinisant serait un oxydant ou un réducteur. Mais, et les agents méthémoglobinisants qui ne sont ni oxydants ni réducteurs, et sur lesquels Dittrich a attiré l'attention? Faudrait-il leur faire correspondre une troisième sorte de méthémoglobine présentant encore les mêmes spectres ?

En somme, la conclusion d'Hüfner est généralement adoptée : *La méthémoglobine contient autant d'oxygène que l'oxyhémoglobine, mais fixé autrement et plus solidement.*

La première partie de cette conclusion dominante a reçu, en 1888, une nouvelle vérification de la part de Lambling [4], qui constata que la méthémoglobine bleuit autant d'indigo blanc qu'une solution d'oxyhémoglobine de même concentration.

La seconde concorde très bien avec les faits connus résultant de l'action comparée du vide et de l'oxyde de carbone sur l'oxyhémoglobine et sur la méthémoglobine.

[1] Journ. of Physiol., **22**, pp. 301-302 (1898).
[2] Article Hémoglobine. 2e suppl. Würtz, p. 66.
[3] Thèse méd. Dorpat, 1892, p. 53.
[4] Bull. Soc. chim., 25 mai 1888.

La méthémoglobine ne serait donc qu'un isomère de l'oxyhémoglobine [1].

Comme l'a fait remarquer Dittrich, la transformation de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine a bien, en effet, l'allure d'autres isomérisations chimiquement connues. L'action favorisante de la chaleur y est du même ordre. La marche de la méthémoglobinisation de l'oxyhémoglobine, sous l'influence de la chaleur, ressemble, par exemple, à celle de la transformation du sulfocyanate d'allyle, $CH^2 = CH — CH^2 — S — C \equiv N$ en sénévol allylique, $S = C = N — CH^2 = CH^2$, qui, lente à la température ordinaire, devient rapide à chaud.

D'autres ont voulu aller plus loin et chercher à s'expliquer comment l'oxygène labile de l'oxyhémoglobine devient stable dans la méthémoglobine.

Ces tentatives théoriques ont été la conséquence de la contradiction apparente qui existe : entre l'action du ferricyanure, qui, en donnant de la méthémoglobine, dégage tout l'oxygène labile de l'oxyhémoglobine, — et la conclusion de Hüfner que la méthémoglobine contient autant d'oxygène que l'oxyhémoglobine.

Haldane et v. Zeynek furent donc amenés à constater la réduction du ferricyanure et à penser qu'elle était l'origine de l'oxygène qui remplace celui dégagé.

Haldane [2] essaie de comprendre la réaction en faisant intervenir le bicarbonate de sodium du sang :

$$\underbrace{Hb\langle {}^{O}_{|}_{O}}_{\text{Oxy-Hb}} + 4\,Na^3FeC^6N^6 + 4\,NaHCO^3 = O^2 + \underbrace{Hb\langle {}^{O}_{O}}_{\text{Met-Hb}} + 4\,Na^4FeC^6N^6 + 4\,CO^2 + 2H^2O$$

[1] J.-R. Carracido fait observer, avec raison, que le nom de *métaoxyhémoglobine* serait plus exact que celui de méthémoglobine (Tratado de Quémica biològica. Madrid, 1903, p. 228).

[2] Journal of Physiology, **22**, p. 301 (1898).

v. Zeynek [1] pense que le produit de la réduction du ferricyanure n'est pas le ferrocyanure ordinaire, et que ce sont des oxhydryles OH qui remplacent dans la méthémoglobine l'oxygène dégagé. Il écrit la réaction en deux phases :

$$[1] \quad 2\,K^3Fe'''C^6N^6 + \begin{matrix} H.OH \\ H.OH \end{matrix} = 2\,K^3HFe''C^6N^6 + \begin{matrix} OH \\ OH \end{matrix}$$

$$[2] \quad \underbrace{Hb\left\langle \begin{matrix} O \\ | \\ O \end{matrix} \right.}_{\text{Oxy-Hb}} + \begin{matrix} OH \\ OH \end{matrix} = \underbrace{Hb\left\langle \begin{matrix} OH \\ OH \end{matrix} \right.}_{\text{Met-Hb}} + O^2$$

Ne retenons de ces interprétations hardies que les symboles sous lesquels Haldane et von Zeynek représentent la méthémoglobine.

Le symbole de Haldane traduit très nettement la conclusion fondamentale de Hüfner L'oxyhémoglobine serait une combinaison d'une molécule d'oxygène avec l'hémoglobine. La méthémoglobine résulterait, au contraire, de l'union de 2 atomes d'oxygène avec le même noyau. Donc, autant d'oxygène, mais autrement fixé. D'après Haldane, ses symboles expliqueraient, en outre, les différences de stabilité de l'oxygène dans les deux molécules qu'ils représentent. Dans $Hb\left\langle \begin{matrix} O \\ | \\ O \end{matrix} \right.$ les atomes d'oxygène, échangeant déjà une valence, seront très facilement dégagés à l'état de molécule libre O^2. Ce qui ne se produira pas avec $Hb\left\langle \begin{matrix} O \\ O \end{matrix} \right.$. Les différences de stabilité en présence du vide s'expliquent donc bien avec ces formules. On dit souvent que l'oxygène de la méthémoglobine est plus solidement fixé que celui de l'oxyhémoglobine. Ce n'est vrai, comme le fait remarquer Haldane, que

[1] Engelm. Archiv. f. Physiol., **1899**, pp. 486-487.

pour l'action du vide. Sous l'influence des réducteurs, $\mathrm{Hb}<\begin{smallmatrix}\mathrm{O}\\ \mathrm{O}\end{smallmatrix}$ donne plus facilement Hb que ne le fait $\mathrm{Hb}<\begin{smallmatrix}\mathrm{O}\\ |\\ \mathrm{O}\end{smallmatrix}$. Les schémas proposés rendent encore compte de ce fait. Ils n'expliquent cependant pas la formation de la méthémoglobine alcaline[1].

L'hypothèse de v. ZEYNEK qui représente la méthémoglobine par $\mathrm{Hb}<\begin{smallmatrix}\mathrm{OH}\\ \mathrm{OH}\end{smallmatrix}$ explique au contraire le caractère faiblement acide de la méthémoglobine, et sa transformation en méthémoglobine alcaline $\mathrm{Hb}<\begin{smallmatrix}\mathrm{OM}\\ \mathrm{OM}\end{smallmatrix}$. Elle explique très simplement l'action du Palladium hydrogéné :

$$\mathrm{Hb}<\begin{smallmatrix}\mathrm{O}\\ |\\ \mathrm{O}\end{smallmatrix} + \begin{smallmatrix}\mathrm{H}\\ \\ \mathrm{H}\end{smallmatrix} = \mathrm{Hb}<\begin{smallmatrix}\mathrm{OH}\\ \mathrm{OH}\end{smallmatrix}$$

Mais elle enlève à la méthémoglobinisation le caractère d'isomérisation que nous lui avons reconnu.

*
* *

Il me semble qu'on pourrait cependant concilier dans une même hypothèse les symboles de v. ZEYNEK et de HALDANE. Il suffit d'appliquer à la méthémoglobine la *théorie des pseudo-acides*[2].

[1] Les hypothèses de v. Zeynek et de Haldane supposent démontrée l'équation proposée par Hüfner pour la dissociation de l'oxyhémoglobine $\mathrm{Hb}<\begin{smallmatrix}\mathrm{O}\\ |\\ \mathrm{O}\end{smallmatrix} = \mathrm{Hb} + \mathrm{O}^2$. Une critique théorique de V. Henri montre que cette équation ne répond pas aux données expérimentales et que ces données sont d'ailleurs insuffisantes pour essayer actuellement une autre formule. [Cf. V. Henri. Soc. Biol., **56**, 339 (1904)].

[2] Voir la conférence de P. Th. Müller. Rev. gén. des Sciences, 15 mai 1905, p. 417.

En fait, la méthémoglobine paraît bien avoir un caractère *pseudo-acide* :

1° Sa neutralisation est lente et progressive.

Si l'on place une solution de méthémoglobine pure devant le spectroscope et qu'on y ajoute très peu de soude étendue, on voit le spectre de la méthémoglobine alcaline apparaître lentement et coexister avec celui de la méthémoglobine acide qui va en s'affaiblissant, tandis que le premier augmente d'intensité[1];

2° Il y a changement de coloration quand on passe de la méthémoglobine acide à la méthémoglobine alcaline.

Le spectre de la méthémoglobine dite acide serait donc dû à la méthémoglobine non ionisée suivant le formule ci-après, qui rappelle celle de Haldane et où ? représente le noyau de la méthémoglobine :

$$\begin{matrix}H\\H\end{matrix}?\begin{matrix}\diagup\!\!\diagup O\\ \diagdown\!\!\diagdown O\end{matrix}$$

Sous l'influence des bases, il se ferait une migration moléculaire et l'on aurait alors les sels de l'**aci-méthémoglobine** (ancienne méthémoglobine alcaline) dont la formule :

$$\left(?<\begin{matrix}O\\O\end{matrix}\right)^{-}\begin{matrix}H+\\H+\end{matrix}$$

rappelle celle de v. Zeynek.

On s'explique ainsi les différences spectrales qui distinguent la méthémoglobine et l'*aciméthémoglobine*, car elles sont dues dans un cas à la molécule $\begin{matrix}H\\H\end{matrix}\!>?\begin{matrix}\diagup\!\!\diagup O\\ \diagdown\!\!\diagdown O\end{matrix}$ et dans l'autre à l'ion $\left(?<\begin{matrix}O-\\O-\end{matrix}\right)^{-}$

[1] Un simple examen spectroscopique remplace donc ici très bien la méthode de la conductibilité électrique employée pour suivre la neutralisation lente des pseudo-acides.

Dans l'hypothèse de v. Zeynek, l'acide

$$\left(Hb{<}^{O}_{O}\right)^{H}_{H}$$

et ses sels

$$\left(Hb{<}^{O}_{O}\right)^{M}_{M}$$

ayant même ion absorbant $\left(Hb{<}^{O}_{O}\right)^{-}$ devraient évidemment avoir même spectre.

En faisant de la méthémoglobine un *pseudo-acide*, on s'explique, en outre, qu'une solution de méthémoglobine brune puisse contenir une faible proportion d'*aciméthémoglobine* rouge, dont la présence se traduirait par les absorptions dans le vert, puisque dans certains cas (p.-nitrophénol, oximidocétones, nitramines, éthers acyl-cyanacétiques, etc ..), on peut trouver, à côté de la forme ordinaire prédominante, un peu de la forme *aci*.

On ne doit évidemment se faire aucune illusion sur le caractère prématuré de telles hypothèses. Cependant elles peuvent avoir la valeur d'idées directrices provisoires. C'est ainsi que le symbole que donnait v. Zeynek pour la méthémoglobine $Hb{<}^{OH}_{OH}$ conduisit cet auteur à découvrir que le composé cyané qui résulte de l'action de CNH sur $Hb{<}^{OH}_{OH}$ devait aussi s'obtenir par l'action de C^2N^2 sur Hb. De même, mon hypothèse de la méthémoglobine-pseudo-acide m'a conduit à quelques observations nouvelles :

Ce caractère pseudo-acide de la méthémoglobine me fit la rapprocher des indicateurs dont le virage, traduisant une transposition intramoléculaire, est commandé par la présence d'ions étrangers OH dans leur solution. Je fus donc amené à étudier les *additions homoïoniques*[1] en présence d'aciméthémoglobine. On sait qu'en

[1] Cf. P.-Th. Müller. — Lois fondamentales de l'Electrochimie, Paris, 1904. pp. 79-80.

ajoutant à la solution d'une base un sel ayant le même métal-ion, on diminue l'ionisation de la base et, par suite, le nombre d'OH actifs. Ainsi en ajoutant NaCl à une solution de méthémoglobine traitée par la quantité de soude juste nécessaire pour avoir nettement le spectre de la forme *aci*[1], il y eut partiellement retour à la forme ordinaire que révéla l'apparition de la bande $\lambda = 634$. Comme les additions homoïoniques sont surtout sensibles pour les *demi-électrolytes*, je pensais arriver à un résultat encore plus net avec l'ammoniaque et les sels d'ammonium. Dans ce cas, j'obtins un spectre nouveau — que mon maître, M. le professeur Ville, avait obtenu par une autre voie, en étudiant l'action du sulfate ammonique — et dont nous nous proposons de poursuivre l'étude. Si l'on prend une solution de méthémoglobine cristallisée pure (sans ferricyanure) telle, qu'additionnée de son volume d'eau distillée et d'une goutte d'ammoniaque, elle donne nettement, sous une épaisseur de 15^{mm}, le spectre de la méthémoglobine alcaline, la même solution, diluée cette fois de son volume d'une solution concentrée d'un sel ammonique, donnera le spectre suivant lorsqu'on y ajoute une goutte d'ammoniaque : une bande large et foncée dans le vert et dont le milieu est voisin de la position qu'occupe la raie du Thallium ($\lambda = 534.9$), — et une ombre floue qui commence un peu avant D et présente un assombrissement mince vers $\lambda = 568$; le bleu et le violet sont absorbés à partir de $\lambda = 500$, tandis que pour la même concentration la méthémoglobine alcaline absorbait à partir $\lambda = 504$ D'autre part, le liquide a une coloration d'un rouge plus clair différent de celui de la méthémoglobine alcaline. Nous ne savons pas encore quelle signification il faut donner à ce spectre. Les réducteurs (sulfure d'ammonium ou liqueur de Stokes suivant notre formule[2] qui permet de l'obtenir légèrement acide) paraissent ne donner que la bande de Stokes. Peut-être avons-nous affaire à une substance qui est à la méthémoglobine ce que l'hémocromogène est à l'hématine ? On se rappelle le rôle[3] que, d'après Bertin-Sans et Moitessier, Linossier, v. Zeynek, l'ammoniaque et les composés à fonctions amine jouent dans la formation de l'hémo-

[1] Spectre de la méthémoglobine alcaline.

[2] Ville et Derrien. — Nouv. Montpellier médical, **14**, 49, 1902.

[3] Lambling. — Article Hémoglobine. 2e suppl. Würtz. p. 79,

chromogène. Nous avons trouvé que certaines amines donnent, en effet, en agissant sur la méthémoglobine, un spectre analogue à celui formé par l'ammoniaque en présence des sels ammoniacaux.

L'obtention de ce spectre nouveau montre que l'ammoniaque non ionisée ne réagit pas comme l'ammoniaque ionisée. Ainsi dans la décoloration de la phénolphtaléine ammoniacale par les sels ammoniacaux, il n'y a pas simplement retour de la forme *aci* à la forme ordinaire, mais formation de diimidophtaléine incolore.

B. — LA MÉTHÉMOGLOBINE EN MÉDECINE

Si l'étude de la méthémoglobine a quelque intérêt en Biologie pure, elle ne saurait en être dépourvue pour cette partie de la biologie appliquée qu'est la Médecine. Bertin-Sans pensait déjà qu'elle devait être appelée à « éclairer divers problèmes médicaux ».

Thérapeutique

Ce sont d'abord les thérapeutes, préoccupés de l'action des substances qu'ils ordonnent, qui se sont intéressés au pouvoir méthémoglobinisant des drogues. Hayem[1] écrit : « De toutes les transformations de l'hémoglobine, la plus intéressante pour le médecin est certainement celle qui aboutit à la production de méthémoglobine. C'est la seule que l'on puisse rencontrer en dehors de tout empoisonnement, par le simple fait de l'emploi de médicaments prescrits à dose dite thérapeutique, et comme le nombre de ces médicaments est relativement considérable et augmente chaque jour rapidement, la question acquiert par là un grand intérêt pratique. » C'est ce qui conduisit Hayem à l'étude que l'on sait sur les lois de la formation de la méthémoglobine

[1] *Du sang et de ses altérations anatomiques*. Paris, 1889 (pp. 359-360).

dans l'organisme, étude à laquelle les travaux récents ont, en somme, peu ajouté.

La méthémoglobine, étant impropre à l'hématose, ne pouvant plus comme l'oxyhémoglobine présider aux oxydations intraorganiques, on a pensé, pour expliquer les propriétés antipyrétiques de certains médicaments, faire entrer en ligne de compte leur action méthémoglobinisante[1].

En fait, presque tous les *antipyrétiques*, à part l'antipyrine qui est plutôt un analgésique et ne méthémoglobinise pas, sont, dans l'organisme, des producteursde méthémo globine. Ils se divisent en deux groupes, suivant le principe de classification de Hayem : 1° ceux qui font simplement de la méthémoglobine intraglobulaire ; 2° ceux qui méthémoglobinisent la matière colorante en détruisant l'hématie qui la porte. Ces derniers sont des médicaments absolument contre-indiqués dans les états anémiques : ils comprennent certains dérivés de la quinoléine et les dérivés de la phénylhydrazine, telle la dangereuse *pyrodine* (acétylphénylhydrazine), médicaments dont heureusement la plupart ont été, suivant l'allitération d'Arnozan, « aussitôt oubliés que publiés ». Le groupe des antipyrétiques qui font de la méthémoglobine intraglobulaire, à part la thalline et la kairine qui sont dérivées de la quinoléine, comprend surtout l'*acétanilide* et substances voisines : *exalgine* (méthylacétanilide), *phénacétine* (paracétylaminophénétol), *méthacétine* (paraoxyméthylacétanilide). Dans ce cas, la méthémoglobine, restant dans le milieu vivant qu'est le globule rouge, fait, comme nous l'avons vu, facilement retour à l'hémoglobine. Cette action méthémoglobinisante passagère intervient ici d'une façon évidente dans le mécanisme complexe de l'antipyrèse, en pro-

[1] Schmidt. — Revue médicale de l'Est, **1892**, p. 507. Cf. aussi G Pouchet. *Leçons de Pharmacodynamie et de Mat. méd.*, 4e série, passim (1904).

duisant, suivant l'heureuse expression de POUCHET, « une saignée virtuelle et temporaire portant exclusivement sur l'hémoglobine [1] ».

Il est un autre médicament assez employé qui, selon HAYEM, fait de la méthémoglobine intraglobulaire : c'est le *nitrite d'amyle*. HAYEM constata [2] *in vitro* que la méthémoglobine formée par le nitrite d'amyle, dans les globules rouges, était rapidement ramenée à l'état d'oxyhémoglobine. Cette restauration doit se faire encore plus vite dans l'organisme, car, suivant la remarque dont HAYEM fait suivre sa 2me loi [3], la vitalité des hématies y est plus active qu'*in vitro*.

Contrairement à cette attente, la clinique a constaté des accidents *tardifs* après les inhalations d'éther amylnitreux (RABUTEAU) [4]. Je crois qu'il n'y a ici qu'un désaccord apparent entre l'expérimentation et la clinique, et cela tient à cette action complexe des *nitrites* sur laquelle j'ai attiré l'attention dans l'étude des agents méthémoglobinisants. Sous leur action, il se fait à côté de la méthémoglobine, de l'*hémoglobine bioxyazotée* aussi impropre à la respiration et même plus stable que la carboxyhémoglobine. Puis, la méthémoglobine déjà formée se transforme peu à peu, sous l'influence des réductions intraorganiques, en nouvelles quantités d'*hémoglobine bioxyazotée* qui, atteignant alors une certaine proportion, peut provoquer des phénomènes graves. HAYEM avait confondu *in vitro* le spectre de l'azoxyhémoglobine avec celui de l'oxyhémoglobine.

[1] Pouchet. — *Loc. cit.*, p. 165, y voir l'exposé du travail de Lépine (1887), sur l'acétanilide.

[2] Du Sang, p. 869.

[3] Hayem, *eodem loco*. p. 368.

[4] Cf. Pouchet. Leçons de Pharmacodynamie, 1re série, 1900, pp. 355-356.

A. Dennig [1] a fait une étude *spectrophotométrique* de quelques médicaments au point de vue de leur action méthémoglobinisante. Il dosait la méthémoglobine par le spectrophotomètre et au moyen des tableaux de Hüfner, dans le sang de chiens qui recevaient *per os* ces médicaments. Il vérifi ainsi que l'antipyrine n'a pas d'action méthémoglobinisante. Sous l'action de l'acétanilide (antifébrine) ou de la phénacétine, la vie n'est plus possible — pour le chien — quand les deux tiers de l oxyhémoglobine sont transformés en méthémoglobine. Pour l'homme il faudrait une transformation de près de 50 °/₀.

Toxicologie clinique et médico-légale

En restant encore sur le terrain de la Pharmacodynamie, on passe donc insensiblement de la Thérapeutique à la *Toxicologie*. Là, en plus de sa valeur pathogénique, la méthémoglobine pourrait, dans certains cas (certaines cliniques possèdent de petits spectroscopes de poche peu coûteux), acquérir une valeur diagnostique. Une goutte ou deux de sang suffiraient pour faire un examen spectroscopique et pour savoir si l'on se trouve ou non en présence d'un poison méthémoglobinisant [2]. Si l'examen est positif, le médecin aura, en plus des indications générales, des indications spéciales à remplir, tirées de ce fait que le poison est *méthémoglobinisant*. Il pourra lutter contre l'abaissement de la capacité respiratoire, résultant de la formation de méthémoglobine, par des inhalations d'oxygène et contre l'action

[1] Ueber die Einwirkung einiger vielgebrauchter Arzneimittel auf die Methämoglobinbildung im Blute (*Deutsch Arch. f. Klin. Med.* **65**, 524-541) (1900).

[2] Voir dans Hayem. — *Leçons sur les maladies du sang*, Paris 1900, la symptomatologie d'un cas curieux de méthémoglobinémie toxique d'origine inconnue.

méthémoglobinisante elle-même, en utilisant les recherches de v. Mering [1] d'après lesquelles cette action s'exercerait d'autant plus facilement que le sang est moins alcalin.

Ce rôle antiméthémoglobinisant des alcalins a été étudié *in vivo* et *in vitro* par P. Masoin [2], mais étant donné la facile confusion par un examen spectroscopique simplement qualitatif, de la méthémoglobine alcaline et de l'oxyhémoglobine, surtout si les deux sont mélangées, cette étude est à reprendre spectrophotométriquement.

Parmi les poisons méthémoglobinisants, signalés comme ayant occasionné des intoxications chez l'homme [3], le *chlorate de potasse* vient au premier rang. Aux cas de mort déjà connus, il faut ajouter l'observation récente d'Albrecht [4] qui montre quel rôle considérable il faut sans doute attribuer aux causes prédisposantes indiquées par von Mering (dyspnée et fièvre, en plus de la diminution de l'alcalinité du sang) et commande, par suite, d'être circonspect dans l'administration des poisons méthémoglobinisants chez certains malades.

On a encore signalé des empoisonnements mortels, *avec méthémoglobinémie*, par : l'acide pyrogallique, la nitrobenzine, la nitroglycérine (trinitrine), l'aniline. Certains cas sont d'origine criminelle La recherche de la méthémoglobine dans le sang peut donc avoir une *valeur médico-légale*. Mais cette valeur diminue à mesure que l'examen est fait plus

[1] Das chlorsaure Kali. Berlin, 1885.

[2] Archives internat. de Pharmacodyn., 5, 307 (1898).

[3] Cf. Vibert. Toxicologie cliniq. et médico-légale. 1900, pp. 382-400.

[4] Société imp. roy. des médecins de Vienne, 24 novembre 1905. Intoxication mortelle, avec méthémoglobinémie, par ClO^3K, chez un enfant de 3 ans qui en prit 1 gr. en 2 jours, mort le deuxième jour. (Cf. *Presse médicale* du 9 décembre 1905.)

tardivement après la mort, la méthémoglobine tendant alors à se réduire en hémoglobine.

Il est à rappeler, d'autre part, que certains de ces poisons, dits méthémoglobinisants peuvent avoir, surtout dans l'organisme, une action plus complexe ou plus profonde sur la matière colorante du sang. C'est ainsi que L. Mohr, dans une étude sur l'*intoxication professionnelle par le benzène et ses dérivés*[1], nota bien la présence de méthémoglobine dans le sang de ses malades, mais trouva, en outre, constamment de l'*hématoporphyrine* dans leurs urines. J'ai encore à signaler ici l'action complexe des *nitrites*. Au point de vue *médico-légal*, il est intéressant de noter que, sous l'influence de la putréfaction, le sang des animaux intoxiqués par les nitrites devient rouge pourpre et montre, au spectroscope, les deux bandes dans le vert de l'hémoglobine bioxyazotée — qui résistent aux réducteurs — présentant, en somme, les réactions de la carboxyhémoglobine, de sorte qu'il pourrait y avoir aisément *confusion avec une intoxication par l'oxyde de carbone* (Haldane, Makgill et Mavrogordato)[2].

Pathologie des Maladies infectieuses

Depuis que l'on sait que les maladies infectieuses sont sous la dépendance des toxines microbiennes et que les infections sont ainsi ramenées aux intoxications, il était naturel de chercher à trouver, là aussi, la méthémoglobine dans le sang. C'est ainsi que Hayem[3] pensa faire cette

[1] Deutsch. medic. Wochenschr., **1902**, n° 5, p. 73.

[2] Journ. of Physiol., **21**, pp. 168-169 (1897)

[3] Du Sang (**1889**), p. 365. — C'est donc à tort que Kobert (Pflüger's. Arch. f. Physiol. **82**. [1900] p. 607) attribue à Maschka (Prag. med Wochenschr., n° 19 [1893]) la priorité de cette idée.

recherche en particulier dans les *septicémies*. Mais il n'avait obtenu en 1889 que des résultats négatifs [1].

D'après M. LABBÉ, dont j'ai déjà examiné l'étude sur l'action méthémoglobinisante des microbes, on trouverait de la méthémoglobine dans les formes graves de *septicémie diphtérique*. (Rappelons qu'*in vitro*, le bacille de Löffler est, d'après lui, le microbe qui a l'action méthémoglobinisante la plus nette.) DE RUYTER a signalé dans le sang des sujets atteints d'*œdème malin* une bande d'absorption dans le rouge, à côté de celles de l'oxyhémoglobine [2] : il faudrait revoir si elle n'est pas due à la méthémoglobine. MARCHAND [3] avait rapproché les modifications que présente le sang dans la *maladie de Winckel* de celles qu'il subit sous l'influence des chlorates ; la recherche de la méthémoglobine serait ainsi à refaire dans cette variété d'ictère infectieux des nouveau-nés. Il serait intéressant enfin d'étudier aussi, à ce point de vue, les maladies, comme la *Malaria*, dont les agents parasitaires s'attaquent surtout aux globules rouges. On a d'ailleurs signalé plusieurs fois la *méthémoglobinurie* dans le paludisme [4].

En somme, pour ce qui concerne le rôle à faire jouer à la méthémoglobine dans la pathogénie ou la symptomatologie des maladies infectieuses, plus de desiderata que d'acquis.

C'est que, comme le fait remarquer M. LABBÉ [5], ces recherches sont très délicates, à cause de la faible quantité de

[1] En 1900, dans ses *Leçons sur les maladies du sang*, il n'a pas encore rencontré de méthémoglobinémie en dehors d'actions pharmacodynamiques.

[2] M. Labbé. Arch. de méd. expérim., **15**, 377 (1903).

[2] Th. Berlin-Sans, p. 73.

[4] D. Pace. Methemoglobinuria parossistica da malaria (Giorn. internat. di Scienz. med., Gen. 1894). Cf. *Blumenthal*. Pathologie des Harnes am Krankenbett. Berlin, 1903, p. 337.

[5] *Loc. cit.* p. 378.

méthémoglobine qui peut exister dans le sang circulant, à cause de sa rapide élimination et à cause aussi de sa transformation subite en hémoglobine réduite au moment de la mort. Ce médecin pense néanmoins que ces recherches mériteraient d'être reprises avec une technique plus perfectionnée. [La spectrophotométrie serait évidemment la méthode de choix si elle ne nécessitait l'emploi d'appareils très délicats et coûteux. Peut-être qu'avec certaines précautions, l'examen spectroscopique en tubes longs pourrait rendre des services. J'examinerai cette question de technique au prochain chapitre.]

Sémiotique

Dans cette partie de la médecine, est-ce encore une insuffisance de technique qui fait qu'une idée intéressante du professeur L. Bard n'a pas donné ce qu'elle aurait pu donner? Pour Bard, l'hémoglobine, «substance cellulaire *dérivée*», naît, meurt et, tout en restant hémoglobine, varie de composition et de résistance suivant les diverses phases de son évolution et suivant les états pathologiques. La clinique pourrait donc retirer de l'étude de ces variations des éléments de diagnostic ou de pronostic. C'est l'idée qui inspira les thèses de deux élèves de Bard, Mallet[1] et Veyrassat[2]. La méthode qui doit apprécier ces *variations de qualité des hémoglobines pathologiques* est basée sur leur *vitesse de transformation en méthémoglobine* sous l'influence du ferricyanure (Mallet). Quelques gouttes de sang sont diluées jusqu'à

[1] Des variations de qualité de l'hémoglobine et de leur valeur clinique. (Th. méd., Genève 1901, n° 10.)

[2] Des variations de résistance des hématies et de l'hémoglobine. (Th. méd., Lyon 1901-1902, n° 159.)

égalité de teinte avec un étalon au picro-carmin ; pour un volume constant, on ajoute six gouttes d'une solution de ferricyanure de potassium à 1/1000 ; le temps qui s'écoule entre la chute de la dernière goutte et l'apparition au spectroscope de la bande dans le rouge est pris comme mesure de la *résistance* de l'hémoglobine. Pour les individus sains, cette résistance serait de 12 à 13 minutes pour MALLET, et de 9 à 10 pour VEYRASSAT. Ce dernier a trouvé que cette *résistance* est toujours diminuée dans tout état pathologique, tout en reconnaissant que le procédé peu précis employé ne permet pas d'en apprécier facilement les degrés.

Mais peut-on espérer qu'une technique meilleure puisse conduire à une mesure clinique de la *résistance de l'hémoglobine à la méthémoglobinisation?* Je ne le crois pas. Car on ne peut, dans les résultats obtenus, faire la part de ce qui revient à l'altérabilité de l'hémoglobine et de ce qui est dû aux *variations de l'alcalinité du sang.*

Voici une expérience qui montre que la bande de la méthémoglobine apparaît d'autant plus lentement que le sang est plus alcalin. J'ai opéré à la température de 14° et avec une solution de ferricyanure de potassium à 1/1000 et récente.

Tubes à essais de 15mm de diamètre, contenant chacun 1 cc. de sang de bœuf défibriné dilué au 1/10 et en plus :		Durée qui s'écoule entre l'addition de 5 gouttes de ferricyanure de potassium et l'apparition de la bande à $\lambda = 634$:
N° 1	1/2cc sol. CO^2NaH 1/1000 (= sol. A) 8cc5 H^2O	une minute environ.
N° 2	1cc sol. A 8cc H^2O	de 1 min. 1/2 à 2 minutes.
N° 3	2cc sol. A 7cc H^2O	de 2 à 3 minutes.
N° 4	3cc sol. A 6cc H^2O	de 4 à 5 minutes.
N° 5	4cc sol. A 5cc H^2O	de 7 à 8 minutes[1].

[1] Le tube 5 laisse voir la bande dans l'orangé ($\lambda = 603$) de la méthémoglobine alcaline à côté d'une faible bande à $\lambda = 634$, et les tubes de 1 à 5 présentent après

On peut donc croire que la diminution de résistance de l'hémoglobine, déterminée par le procédé MALLET, traduit surtout une diminution de l'alcalinité du sang.

Certaines observations cliniques de la thèse de VEYRASSAT viennent à l'appui de cette interprétation. L'*altérabilité* de l'hémoglobine y apparaît très variable dans les *néphrites*. Dans l'observation XXIX, elle est de 7', presque normale, et dans l'observation XXXII elle n'est que de 3'. Or, on peut voir que le malade XXIX élimine encore assez bien et n'a que peu d'œdème, tandis que le malade XXXII a le rein bien plus fermé et de l'œdème généralisé, et l'on sait que l'acidité que n'excrète pas le rein diminue le titre hémo-alcalimétrique. Les observations de *chlorose* dénotent toutes une diminution de la résistance de l'hémoglobine. C'est que ce sont des chloroses déjà avancées. Or, on sait qu'à ce moment le titre hémo-alcalimétrique s'abaisse au point que l'alcalinité devient à peine sensible. On aurait, au contraire, noté, sans doute, une augmentation de résistance à la période initiale, lorsqu'il n'y a qu'*oligochromémie dans oligocythémie*, car alors le titre hémo-alcalimétrique est notablement augmenté. (GRÆBER)[1]. En fait, quelques observations de la thèse de MALLET accusent pour la résistance de l'hémoglobine des chiffres supérieurs à la moyenne normale, qui est de 12 à 13' pour cet auteur. Son observation XXIX donne notamment 18 minutes. Il s'agit d'une anémie causée par des hémorragies intestinales intermittentes, où, après chaque crise, « le taux de l'hémoglobine baisse beaucoup, tandis que les globules restent en proportion assez notable ». L'alcalinité n'a pas été dosée, mais elle doit être augmentée alors comme dans les autres cas d'oligochromémie

méthémoglobinisation, une pointe de rose, dans leur coloration brune, qui va en s'accentuant de 1 à 5. Ce qui montre que les retards à l'apparition de la bande à $\lambda = 634$ sont dus aux temps pris pour la formation préalable de quantités croissantes de méthémo-alcaline. Ceci donne une idée de ce que peut être la soi-disant action antiméthémoglobinisante des alcalins.

[1] Cf. Lambling. Encyclop. Frémy. Le sang et la respiration, p. 224, et aussi la thèse de Drouin toujours citée pour tout ce qui touche à l'alcalinité du sang. (Thèse méd. Paris 1892, n° 83.)

sans oligocythémie de GRÆBER. Les rapports de la vitesse de méthémoglobinisation et de l'alcalinité du sang, tels que je viens de les indiquer, mériteraient donc une vérification clinique — avec dosage de l'alcalinité. On verrait, ensuite, s'il y a lieu d'améliorer le procédé MALLET qui, alors, ne renseignerait plus sur l'altérabilité de l'hémoglobine, mais pourrait donner des notions sur les variations de l'alcalinité du sang, et celà d'une façon simple, avec quelques gouttes de sang seulement.

DEUXIÈME PARTIE

SUR LA BANDE D'ABSORPTION QUE L'ON VOIT DANS LE ROUGE

A L'EXAMEN SPECTROSCOPIQUE DU SANG LAQUÉ DILUÉ

Sous une grande Epaisseur

Presque toutes les observations de spectroscopie biologique, et notamment celles dont vient de s'occuper la première partie de ce travail, ont été faites sur de faibles épaisseurs de liquide, en général 1 à 2 centimètres. C'est que l'on pense généralement qu'on peut avoir toutes les absorptions possibles en faisant varier la concentration seulement. Presque tous les auteurs écrivent que faire varier la concentration ou faire varier l'épaisseur, cela « revient au même » [1]. M. DE THIERRY [2] dit, cependant, avoir démontré expérimentalement, dans toute son exactitude, le principe suivant : *le pouvoir absorbant augmente plus vite avec l'épaisseur qu'il ne diminue par la dilution*, et cela jusqu'à une limite assez reculée. Ce qui le conduisit à faire construire différents appareils, dits « grands spectroscopes d'absorption » (1885) ou « héma-

[1] Cf. Hénocque (Spectroscop. biol.). L.-G. de Saint-Martin (Spectrophot. du sang, p. 53), etc.

[2] Introduction à l'étude de la chimie. Paris, 1906, p. 291. Voir ce même ouvrage pour les autres indications bibliographiques concernant cet auteur.

spectroscopes » (1888, 1894.) Il observa ainsi dès 1885 des dilutions sanguines dans des tubes longs de 10 mètres. Je crois qu'à ce point de vue il détient le record. Et si, sous l'influence de la longueur des tubes où on les observe, les dilutions sanguines, ou l'oxyhémoglobine, acquièrent de nouvelles propriétés spectrales, il doit certainement les avoir vues. Il dit, en effet, avoir ainsi observé, pour l'oxyhémoglobine une nouvelle bande d'absorption dans le rouge.

Tout récemment, MM. Piettre et Vila [1], utilisant le dispositif qui servit en 1897 à Etard pour l'étude des chlorophylles, signalèrent, dans le spectre du sang, une bande d'absorption non encore observée par eux. Cette bande se trouve dans le rouge et a son axe vers le $\lambda = 634$. Ils l'ont vue en examinant sous une épaisseur de 20^{cm} du sang de cobaye à différentes dilutions. Si l'on opère à une température variant entre 15° et 22°, la présence de cette bande est incertaine dans les premiers moments de l'observation. En chauffant à 37°, le phénomène est instantané. Les solutions de cristaux d'oxyhémoglobine donnent les mêmes résultats. Le sang dilué avec des solutions isotoniques ne présente pas d'absorption dans le rouge. Sous l'influence du *fluorure de sodium*, la nouvelle bande d'absorption passe du $\lambda = 634$ au $\lambda = 612$.

Etudiant, à ce moment, la modification du spectre de la *méthémoglobine* sous l'action du fluorure de sodium, et cette modification se traduisant surtout par le remplacement de la « bande de la méthémoglobine » ($\lambda = 634$) par une nouvelle bande vers le $\lambda = 612$, nous avons fait remarquer alors [2], mon maître le Pr Ville et moi, que *la nouvelle bande* de MM. Piettre et Vila était due, sans doute, à une *méthémoglobinisation partielle de la matière colorante du sang*. La diffé-

[1] C. R., **140**, 390 (6 février 1905).

[2] Ville et Derrien, C. R., **140**, 743 (13 mars 1905).

rence que ces auteurs indiquent entre le sang laqué et le sang qui a conservé son intégrité globulaire, grâce à des solutions isotoniques, confirmait notre manière de voir; cette différence s'expliquant en effet, comme on l'a vu, par la plus grande résistance à la méthémoglobinisation qu'offre l'oxyhémoglobine fixée dans le globule rouge.

Sur ces entrefaites, MM. Piettre et Vila [1] s'étaient aperçus que l'axe de leur nouvelle bande coïncidait avec celui de la bande classique de la *méthémoglobine*. Ils maintiennent cependant que, dans leurs observations, la bande en question appartient bien à l'oxyhémoglobine, *parce que* des cristaux de cette substance, récemment préparés et écrasés entre deux lames de verre, la présentent nettement. Ils concluent donc que l'oxyhémoglobine possède un spectre à *3 bandes* [2]. Mais si des cristaux écrasés entre deux lames de verre présentent, *sous cette faible épaisseur*, cette bande, elle n'est donc pas due, comme ils l'avaient indiqué [3], à « la longueur de la colonne de substance active traversée par la lumière ». D'autre part, le fait que des cristaux d'oxyhémoglobine présentent cette bande ne veut pas dire qu'elle fasse partie du spectre de l'oxyhémoglobine. On sait, au contraire, combien il est difficile de se mettre à l'abri de tous les agents méthémoglobinisants qui interviennent dans la préparation de ces cristaux. J'ai, à plusieurs reprises, attiré l'attention sur ce point dans l'étude des « agents méthémoglobinisants ». On y a vu notamment l'action méthémoglobinisante de l'éther incriminée par Mayet [4]. Or MM. Piettre et Vila ont employé l'éther [5].

[1] P. et V. C. R., **140**, 685, (6 Mars 1905).
[2] P. et V. C. R. **140**, 1060 (10 avril 1905),
[3] P. et V. C. R., **140**, 390 (6 février 1905).
[4] C. R. **109**, 156, (1889).
[5] P et V. Bull. Soc. chim. (3), **33**, 507, (20 avril 1905).

On sait aussi que dans le procédé d'Hoppe-Seyler, employé par ces auteurs, « les eaux-mères contiennent toujours de la méthémoglobine en quantité d'autant plus forte que l'on a employé plus d'alcool et que la température était moins basse » (Henninger)[1]. On sait, d'autre part, depuis Hoppe-Seyler (1865), que le fait de déssécher les cristaux d'oxyhémoglobine les méthémoglobinise en partie. Les oxyhémoglobine et méthémoglobine du même animal sont isomorphes. Certains auteurs ont pu observer la transformation dans le cristal[2]. Et nous avons vu des expérimentateurs, ayant sur la question le plus d'autorité, notamment Hüfner[3], employer, comme méthémoglobine cristallisée, des cristaux d'oxyhémoglobine qui s'étaient spontanément méthémoglobinisés.....

D'ailleurs, MM. Piettre et Vila ont, dans quelques cas, obtenu des cristaux d'oxyhémoglobine ne présentant pas dans leur spectre la bande dans le rouge : notamment en partant du sang de cobaye[4]. Ces cristaux étaient sans doute ceux obtenus sans intervention d'alcool[5].

Comment donc attribuer à l'oxyhémoglobine cette absorption capricieuse, inconstante et sans aucun rapport avec les absorptions classiques du vert ? Même à l'examen spectroscopique en tubes longs, la présence de la bande à $\lambda = 634$ est incertaine (à 17° 22°) dans les premiers moments qui suivent la prise du sang[6] ; mais on la fait toujours apparaître *en chauffant vers 38°*[7].

[1] 1er suppl. au Dict. de Vürtz, article Hémoglobine, p. 897.
[2] Uhlik. — Pflüger's Archiv f. Physiol., **104**, 78-79.
[3] Hüfner et Reinbold. — Engelm. Archiv f. Physiol. **1904**, suppl. 392.
[4] P. et V. Bull. Soc. chim., 20 avril 1905, p. 509.
[5] P. et V., *idem*, p. 507.
[6] Piettre et Vila. — C. R., **140**, 390.
[7] P. et V. Bull. Soc. Chimiq., 20 avril 1905, p. 507.

Or, cela est conforme aux observations faites sur l'action méthémoglobinisante de la chaleur. Nous[1] l'avons démontré de nouveau en nous plaçant à l'abri des microbes. On ne peut donc attribuer à l'oxyhémoglobine la bande à $\lambda = 634$ qui traduit ainsi une modification lentement progressive de cette matière colorante : modification qui consiste en sa transformation en méthémoglobine.

D'ailleurs, toutes les réactions spectrales, indiquées par MM. Piettre et Vila pour leur bande à $\lambda = 634$ et observées sous 20^{cm}, ne sont, pour la plupart, que celles connues pour la bande de la méthémoglobine ; ou, peuvent aisément s'obtenir avec des solutions de *méthémoglobine cristallisée*, observées sous un ou deux centimètres seulement.

Je pourrais indiquer encore contre l'interprétation de ces auteurs, que, comme je l'ai observé, même sous 20^{cm}, le sang saturé d'oxyde de carbone ne présente pas (ou ne présente que très tardivement) la bande à $\lambda = 634$. Et cela est conforme aux expériences de Weyl et Anrep et de Bertin-Sans et Moitessier, qui ont montré que la carboxyhémoglobine résiste mieux que l'oxyhémoglobine aux agents méthémoglobinisants.

Il est donc démontré, et surabondamment, que la bande qu'ont vue, dans le rouge M. de Thierry et MM. Piettre et Vila, en examinant des dilutions sanguines sous une grande épaisseur, n'est autre que la bande de la *Méthémoglobine*.

On comprend alors que l'examen spectroscopique des liquides, dans ces conditions, puisse déceler la méthémoglobine là où l'on ne pouvait la mettre en évidence par l'examen spectroscopique ordinaire : mais on ne comprenait pas que le seul fait d'observer une matière colorante sous une grande épaisseur puisse lui conférer des propriétés spectra-

[1] Ville et Derrien, C. R., **140**, 1195.

les nouvelles : plusieurs auteurs, et notamment M. Etard[1], ayant montré que les spectres absorbés sont des spectres de molécules.

*
* *

Les publications de MM. Piettre et Vila auront eu néanmoins le mérite d'appeler de nouveau l'attention sur la facilité avec laquelle se méthémoglobinise la matière colorante du sang. Il était si fréquent de rencontrer la bande de la méthémoglobine[2] à l'examen spectroscopique des liquides hématifères, qu'on oubliait l'importance que pouvait avoir par ailleurs ce fait.

Si l'on s'en rapporte aux conclusions de MM. Piettre et Vila, il semble que la matière colorante du sang doive commencer à se méthémoglobiniser dès le laquage. Ces auteurs indiquent en effet que la bande à $\lambda = 634$ fait partie du spectre de l'oxyhémoglobine *dès que le pigment sanguin a quitté le complexe globulaire*[3].

C'est que, dans les conditions de température où ils se sont placés, la méthémoglobinisation peut commencer dès ce moment, comme nous l'avons indiqué[4].

Mais si on se place dans des conditions où cette méthémoglobinisation ne se fait pas, on peut avoir des solutions d'oxyhémoglobine ayant quitté le « complexe globulaire » et ne présentant pas cependant de bande dans le rouge même sous 20^{cm}.

[1] C. R., **120**, 1057 (1895).

[2] Lambling, par exemple, écrit (article Hémoglobine, *loc., cit.* p. 46) : « Souvent on aperçoit en même temps, dans le rouge, entre C et D, *la bande de la méthémoglobine,* parce que ce composé prend naissance aux dépens de l'oxyhémoglobine sous des influences multiples. »

[3] P. et V. C. R. **140**., 1060.

[4] Ville et Derrien. **140**. 1549.

MM. Piettre et Vila disent eux-mêmes que le sang laqué, *maintenu à 0°*, et examiné sous 20^{cm}, ne présente pas de bande dans le rouge[1].

Nous avons vu, d'ailleurs, en étudiant l'action de la chaleur, que Hoppe-Seyler indiquait, dès 1865, que la transformation de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine ne peut être évitée qu'au-dessous de 0°, et que Dittrich (1891) constatait que, si du sang dilué à 1/70 présentait, sous faible épaisseur, et à 48°, la bande dans le rouge au bout de 17 heures, le même sang, maintenu à 0°, ne la présentait pas encore au bout de 14 jours.

L'ensemble de ces faits et l'interprétation que nous en avons donnée conduisent ainsi à ces conclusions intéressantes :

1° *Le laquage n'est pas à lui seul un agent méthémoglobinisant.*

2° **En dehors du globule rouge et au-dessus de 0°, l'oxyhémoglobine est toujours mêlée de plus ou moins de méthémoglobine.**

A propos de cette dernière conclusion, un rapprochement s'impose, intéressant au point de vue des caractères généraux de la biologie du sang. De même qu'en dehors du globule rouge, l'oxyhémoglobine n'est stable qu'au-dessous de 0°, de même en dehors des vaisseaux, le sang total n'est stable qu'à la même température. Si l'on élève celle-ci, le sang se coagule, — l'oxyhémoglobine se méthémoglobinise progressivement.

*
* *

L'observation spectroscopique sous grande épaisseur permet ainsi de suivre les premiers stades de la méthémoglo-

[1] P. et V., C. R. **140**, 1060.

binisation qui échappaient à l'examen sous faible épaisseur.

Bien des auteurs s'étaient rendu compte que la recherche spectroscopique de la méthémoglobine par la méthode ordinaire n'a de valeur que si elle est positive Hayem [1] reconnut ainsi que la sensibilité du spectroscope n'est pas aussi grande qu'on pourrait le croire, et fut amené à montrer que *la mesure de la capacité respiratoire indique la formation de méthémoglobine avant l'examen spectroscopique ordinaire* [2].

O. Cohnheim [3] pense aussi que l'affaiblissement de la dissociation de l'oxyhémoglobine traduit le commencement de sa méthémoglobinisation.

L'examen spectroscopique sous grande épaisseur vient confirmer les opinions de ces auteurs.

Il est donc probable que les désaccords, récemment signalés par Lambling [4] dans les derniers travaux sur la dissociation de l'oxyhémoglobine, tiennent, surtout, à ce que les différents expérimentateurs se sont servis d'un pigment plus ou moins méthémoglobinisé.

Lœwy et Zuntz ont, en effet, montré l'influence du mode de préparation de l'oxyhémoglobine. Toutes choses égales d ailleurs, l'oxygène est beaucoup plus fortement retenu pour l'oxyhémoglobine préparée avec intervention d'*alcool* que pour celle où la cristallisation a été opérée, par exemple, par dialyse de la purée des globules contre de l'eau distillée froide.

Cela concorde avec l action méthémoglobinisante de l'alcool que j'ai signalée à plusieurs reprises, et avec ce fait que les cristaux de cobaye, obtenus sans alcool, par MM. Piettre et Vila ne présentaient pas la bande dans le rouge.

[1] Du sang (1889), p. 363.

[2] Hayem. — *Loc. cit.*, p. 372.

[3] Chem. d. Eiweissk., 2e édit., p. 243.

[4] Revue annuelle de Chim. physiol. Rev. gén. des Sciences, **1905**, p. 81.

Peut-on employer l'examen spectroscopique sous grande épaisseur pour la recherche de la méthémoglobine? — Si l'on ne prend aucune précaution, il est évident, maintenant que l'on connaît la grande facilité avec laquelle se méthémoglobinise l'oxyhémoglobine, qu'on trouverait ainsi de la méthémoglobine partout où il y aurait de l'oxyhémoglobine dissoute.

La méthode ne pourra être utilisée pour la recherche de la méthémoglobine préformée dans l'organisme, qu'en examinant, à basse température, les liquides biologiques maintenus, dès l'instant de leur récolte, à 0°.

D'autre part, on a vu, à propos des composés de la méthémoglobine, que celle-ci constitue par les spectres caractéristiques qu'elle donne avec CNH, H^2O^2, et avec les fluorures, comme nous allons le voir, un réactif très sensible de ces composés à faible poids moléculaire. La sensibilité de telles réactions sera extrêmement augmentée par la substitution de l'examen spectroscopique sous grande épaisseur à l'examen ordinaire.

TROISIÈME PARTIE

ACTION DES FLUORURES SUR LA MÉTHÉMOGLOBINE

Les physiologistes emploient, depuis assez longtemps déjà les fluorures et notamment le fluorure de sodium. Ils ont souvent traité le sang par cet agent, à la fois anticoagulant et antiseptique, sans noter de modification de l'oxyhémoglobine sous son influence. Bien plus, en 1893, M. ARTHUS et A. HUBER [1] décrivaient un nouveau procédé d'obtention de cristaux d'oxyhémoglobine, en milieu fluoré à 1 °/₀. Ils obtinrent ainsi de très beaux cristaux qui, examinés au microspectroscope, ne présentaient que le spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine.

Cependant, en 1895, MENZIES [2] remarqua que des extraits aqueux de tissu splénique, auxquels il avait ajouté du fluorure de sodium pour les conserver, avaient changé de couleur. Le liquide, d'un rouge cramoisi, examiné au spectroscope, présentait deux nouvelles bandes, à $\lambda = 612$ et $\lambda = 500$, les deux bandes de l'oxyhémoglobine étaient presque effacées. MENZIES obtint le même spectre en traitant des solutions

[1] C. R. Soc. Biol., **45**, 970 (1893).

[2] Journ. of physiol., **17** (1895), p. 410 et pl. IX, fig. 8.

d'oxyhémoglobine cristallisée par NaF. « L'addition d'un peu d'acide acétique augmente l'intensité de la bande dans l'orangé et fait disparaître les bandes de l'oxyhémoglobine. »

Menzies remarquait enfin que la bande qu'il venait de découvrir occupe une position voisine de celle de l'hématine, mais qu'elle s'en distingue et par son intensité (*extremely pronounced*), et par l'action des réducteurs.

Il est donc juste de désigner la bande qui apparaît sous l'action des fluorures à $\lambda = 612$, sous le non de *bande de Menzies,* ainsi que nous l'avons proposé, le professeur Ville et moi.

Menzies attribuait les nouvelles apparences spectrales à ce que NaF transforme l'oxyhémoglobine en une espèce de méthémoglobine : « *into a form of methæmoglobin* »[1].

Nous avons vu que MM. Piettre et Vila signalèrent récemment[2] que la nouvelle bande que l'on voit à $\lambda = 634$, lorsqu'on examine les dilutions sanguines sous une épaisseur de 20 centimètres, se déplace, sous l'influence de NaF, à $\lambda = 612$.

De notre côté, le professeur Ville et moi, en étudiant l'action du fluorure de sodium sur la *méthémoglobine*, nous fîmes, à ce moment, remarquer[3] que : lorsqu'à une solution de méthémoglobine ou de sang méthémoglobinisé on ajoute un peu d'une solution récente de fluorure de sodium pur, on constate que la bande dans le rouge, la plus foncée et la plus nette du spectre de la méthémoglobine acide, disparaît pour faire place à une nouvelle bande plus intense, située bien à droite de la précédente (quand on a l'extrémité rouge du spectre à gauche). Le milieu de cette bande se trouve vers $\lambda = 612$, alors que l'axe de la bande dans le

[1] Menzies, *loc. cit.*, p. 414 (conclusion n° 8).
[2] P. et V. C. R, **140**, 390 (6 février 1905).
[3] Ville et Derrien, **140**, 743 (13 mars 1905).

rouge de la méthémoglobine est situé vers $\lambda = 633$. Ces faits ont été observés à l'examen spectroscopique ordinaire, sous une épaisseur de 15 millimètres, avec du sang dilué traité par différents agents méthémoglobinisants, avec des solutions de cristaux d'oxyhémoglobine en partie méthémoglobinisés spontanément et avec des solutions de méthémoglobine cristallisée.

En plus de la bande à $\lambda = 612$, le spectre des solutions de méthémoglobine fluorée présente une bande plus large et moins foncée, située entre b et F, à l'union du vert et du bleu. Cette bande d'absorption rappelle la quatrième bande du spectre de la méthémoglobine acide, mais elle empiète plus sur le bleu que cette dernière et son milieu se trouve vers le $\lambda = 494$ [1].

Nous obtenons donc ainsi en traitant la *méthémoglobine*, en solution, par NaF, *d'une façon immédiate*, les apparences spectrales qui ne s'étaient manifestées qu'à la longue dans les extraits spléniques et les solutions d'oxyhémoglobine observés par Menzies.

Menzies trouve que la bande entre b et F est à $\lambda = 500$, mais il reconnaît, au commencement de son mémoire, n'être pas très sûr de ses déterminations dans cette région du spectre. Le spectre observé par Menzies est donc dû à l'action de NaF non sur l'oxyhémoglobine, comme il le pensait, mais sur la *méthémoglobine* qui en dérive si facilement. C'est pourquoi il rendait le phénomène plus net en ajoutant un peu d'acide acétique. Il reconnaît d'ailleurs, lui-même, quel-

[1] Ville et Derrien. C. R., **140**, 1196. (1er mai 1905). MM. Piettre et Vila ont signalé plus tard (5 mai 1905) (Bull. Soc. chim., **33**, 576) une bande au même $\lambda = 494$ *sous l'influence du ferricyanure*. Un peu plus tard (15 mai) (C. R., **140**, 1351), ils attribuent cette même bande ($\lambda = 494$) au sang frais et à l'oxyhémoglobine fluorée ou non. Sous l'influence du ferricyanure, elle se place cette fois-ci au $\lambda = 500$.

ques pages plus loin, une action méthémoglobinisante à l'acide acétique dilué (Piettre et Vila[1] ont retrouvé récemment cette action de l'acide acétique sur le renforcement de la *bande de Menzies* — quand on opère en présence d'un excès d'oxyhémoglobine)[2].

Voici quels sont les caractères des solutions de méthémoglobine traitées par le fluorure de sodium. Comme ces caractères sont les mêmes si l'on remplace NaF par le fluorure d'ammonium, les fluosilicates, les fluoborates et les fluotitanates alcalins, et aussi par l'acide fluorhydrique en solution très diluée, nous désignerons la méthémoglobine ainsi traitée sous le nom de méthémoglobine *fluorée*.

Tandis que les solutions de méthémoglobine dite acide sont brunes monochroïques, les solutions de méthémoglobine *fluorée*, observées à l'état concentré, sont d'un rouge grenat un peu vert, rappelant assez bien la coloration du dessous des feuilles de certains bégonias. Les solutions diluées présentent cette coloration à la lumière réfléchie et sont verdâtres à la lumière transmise.

Leur spectre d'absorption présente les deux bandes qui viennent d'être indiquées.

La *bande de Menzies* est la plus nette. Son bord gauche (celui situé vers le rouge) est mieux limité que son bord droit, qui est estompé et s'étend plus ou moins vers le jaune suivant la concentration.

Avec quelles autres absorptions de la même région, produites par d'autres dérivés de la matière colorante du sang, pourrait-on la confondre ?

L'hématine alcaline présente, en général, une bande floue

[1] P. et V. C. R., **140**, 1060 (10 avril 1905).

[2] On constate aussi un léger renforcement de la bande de Menzies en acidulant des solutions de méthémoglobine fluorée qui contiennent encore un peu de méthémoglobine alcaline.

qui dépasse la raie D, et dont l'axe est plus rapproché du jaune ($\lambda = 606$).

ZIEMKE et MÜLLER ont publié (Archiv f. Physiol., 1901. Suppl. p. 180) un spectre qui présente, dans l'orangé, une absorption ressemblant fort à la *bande de Menzies*. Elle s'étend, d'après leur dessin, entre les $\lambda\lambda$ 625 et 600, ayant par conséquent son axe vers $\lambda = 612$. Mais son bord gauche est moins net que celui de la *bande de Menzies*. Le reste du spectre ne présente d'ailleurs rien de commun avec celui de la méthémoglobine fluorée. ZIEMKE et MÜLLER ont obtenu ce spectre avec l' « hématine neutre » préparée par la méthode d'ARNOLD.

D'autre part, on sait que, dans certains cas (alcool et sels), la bande de l'hématine alcaline est renforcée. Les liquides présentent alors des colorations voisines de celles des solutions de méthémoglobine fluorée [1], mais qui ont toujours une pointe de jaune.

Action des réducteurs

D'ailleurs, dans tous ces cas, on aura, sous l'action des réducteurs, le spectre de l'hémochromogène, tandis qu'avec la méthémoglobine fluorée on observe alors la bande de Stokes.

Si la solution de méthémoglobine fluorée est ancienne, il se sera formé un peu d'hématine et l'on verra se surajouter à la bande de Stokes la première bande de l'hémochromogène. (Cela n'est pas spécial à NaF; l'action du temps se fait sentir de la même façon sur les solutions de méthémoglobine alcaline et de cyanométhémoglobine, par exemple,

[1] Cf. Ipsen. Vierteljahresb. f. gerichtl. Med., **19**, 1 (1900).

qui, à la longue, peuvent ne plus donner, sous l'influence des réducteurs, que le spectre de l'hémochromogène [1].)

Action des alcalis

Sous l'influence des alcalis, ainsi que des carbonates et bicarbonates alcalins, les solutions de méthémoglobine fluorée donnent le spectre de la méthémoglobine alcaline. L'addition ménagée d'acide chlorhydrique très dilué fait réparaître le spectre de la méthémoglobine fluorée.

On peut aussi obtenir le spectre de la méthémoglobine fluorée à partir d'une solution de méthémoglobine alcaline ; mais, dans ce cas, il faut ajouter NaF, en poudre, en grande quantité. Nous avons quelquefois, dans cette expérience, pu déceler une apparition de la bande à $\lambda = 634$ précédant la formation de la bande à $\lambda = 612$. Il semble donc que la méthémoglobine ne réagisse pas avec les fluorures lorsqu'elle existe sous la forme qui donne le spectre dit alcalin. NaF ajouté agit d'abord comme nous avons vu agir NaCl sur la méthémoglobine alcaline, pour la ramener à l'état de méthémoglobine brune, qui est alors sensible à l'action de NaF.

Action des sels neutres

Les sels neutres (NaCl, Na^2SO^4, $MgSO^4$, $NaNO^3$, etc.) transforment la méthémoglobine fluorée en méthémoglobine acide. C'est ainsi, par exemple, qu'en ajoutant goutte à goutte une solution saturée de NaCl à une solution de méthémoglobine fluorée, placée, dans un tube à essais, devant la fente du spectroscope, on constate que la *bande de Menzies* diminue d'intensité en s'élargissant à gauche, par suite de la

[1] Ziemke et Müller, *loc. cit*, p. 185.

transformation partielle de la méthémoglobine fluorée en méthémoglobine acide ; la présence de cette dernière s'accuse de plus en plus et, finalement, on observe exclusivement le spectre de la méthémoglobine acide[1].

Action des nitrites

Les nitrites, nous l'avons vu à plusieurs reprises, ont une action complexe sur la matière colorante du sang. Leur action spéciale s'accuse encore ici. MM. Piettre et Vila ont, en effet, constaté[2] (sous 20^{cm}) que, en présence des nitrites et du fluorure de sodium, la matière colorante du sang absorbe la lumière rouge autour de $\lambda = 620$. Cette nouvelle position caractérise, pour ces auteurs, « le complexe coloré soumis à la double influence des composés nitrés et fluorés[3] ».

Nous venons de voir que, sous l'influence des sels neutres en présence des fluorures, on pouvait avoir des mélanges de méthémoglobine et de méthémoglobine fluorée et que la juxtaposition des deux spectres pouvait donner dans l'orangé des absorptions dont les intensités maxima étaient comprises entre $\lambda = 634$ et $\lambda = 612$. On peut donc avoir ainsi une bande à $\lambda = 620$ sans qu'intervienne de composé nitré.

J'ai constaté, d'autre part, que de l'hématine pure (procédé Cazeneuve), dissoute dans de l'alcool acidulé par l'acide fluorhydrique donne une bande d'absorption dont le milieu est à $\lambda = 620$, sans qu'intervienne de composé nitré.

Cependant le nitrite de sodium a bien une action spéciale sur la méthémoglobine fluorée.

En ajoutant d'une solution récente de nitrite de sodium à des solutions de méthémoglobine fluorée donnant un spectre caractéristique net, examinées dans des tubes à essais de 15^{mm} de diamètre, on constate qu'il ne se produit de changement qu'au bout d'un certain temps. Les solutions prennent peu à peu une coloration

[1] Ville et Derrien. C. R., **140**, 1195 (1er mai 1905).

[2] P. et V. C. R., **140**, 1060 (10 avril 1905).

[3] P. et V. Bull. Soc. chimiq. (3), **33**, p. 576.

nettement verte en couche mince, présentant, par réflexion, une sorte de fluorescence brune. Corrélativement la bande de Menzies se modifie et l'on observe, en effet, une absorption lui ressemblant, mais située vers $\lambda = 620$.

Le phénomène se produit instantanément si, après avoir ajouté la solution de nitrite à la solution de méthémoglobine fluorée, on traite le mélange par un peu d'un réducteur. La bande à $\lambda = 620$ résiste aux réducteurs et aux alcalis. Je me propose de rechercher si ces phénomènes ne sont pas dus à un dérivé spécial de l'azoxy-hémoglobine, ou s'ils ne traduisent pas plutôt une altération profonde de la matière colorante du sang.

Action de l'acide cyanhydrique

En ajoutant un peu d'une solution étendue de CNH à une solution de méthémoglobine fluorée, *la bande de Menzies* disparaît, tandis que le liquide prend la coloration rose clair de la cyanométhémoglobine et montre, dans son spectre, l'absorption caractéristique du vert autour de $\lambda = 534$. La réaction inverse est plus difficile à réaliser. Comme je l'ai constaté avec le professeur Ville, il faut presque saturer de NaF une solution de cyamométhémoglobine pour y faire apparaître la *bande de Menzies*.

L'ensemble de ces réactions montre que la modification spectrale qu'impriment à la méthémoglobine les composés fluorés de l'ordre des fluorures, et notamment le fluorure de sodium, n est pas due à une modification profonde de la méthémoglobine. L'obtention d'hémoglobine réduite par le sulfure ammonique, la facile transformation en cyanométhémoglobine, le fait que les spectres de la méthémoglobine acide et de la méthémoglobine en solution fluorée puissent se transformer l'un dans l'autre suivant la quantité de fluorure et de sels neutres en présence, tout amène à penser que le spectre caractéristique entrevu par Menzies, et dont

nous avons fait l'étude [1], le professeur VILLE et moi, est dû, comme nous l'avons dit, à une combinaison fluorée de la méthémoglobine.

Obtention de cristaux de méthémoglobine fluorée

Nous fûmes ainsi conduits à essayer d'obtenir cette combinaison à l'état cristallisé.

Nous y sommes parvenus en employant le procédé au sulfate ammonique (modification du procédé de Schulz) qui a été décrit à propos de la préparation de la méthémoglobine cristallisée. Il suffit de partir d'une solution concentrée de méthémoglobine cristallisée, additionnée de suffisamment de NaF pour qu'elle donne nettement le spectre à 2 bandes de la méthémoglobine fluorée.

Nous avons ainsi obtenu [2] une abondante cristallisation (avec la méthémoglobine de cheval). Les cristaux ont le même aspect géométrique que ceux obtenus avec la même méthémoglobine dans les mêmes conditions; mais ils s'en distinguent très nettement par leur coloration et leurs propriétés spectrales.

Ils présentent le dichroïsme observé avec la solution de méthémoglobine fluorée : les lamelles minces apparaissent au microscope colorées en vert; les prismes, plus épais, offrent la coloration rouge bégonia spéciale. Souvent nous avons pu voir, en observant les cristaux dans une couche liquide assez épaisse pour qu'ils puissent s'y mouvoir, apparaître alternativement dans un même cristal les deux colorations suivant qu'il se présentait de face ou de champ.

[1] Nous avons entrepris une étude spectrophotométrique de la méthémoglobine fluorée, qui doit apporter de nouveaux arguments à l'appui de notre manière de voir.

[2] Ville et Derrien, C. R., **140**, 1195 (1er mai 1905).

Les plus larges lamelles peuvent être examinées *au microspectroscope*. Elles absorbent les mêmes radiations que les solutions fluorées de méthémoglobine.

Toutefois cette combinaison est *instable*. Les cristaux ne peuvent être conservés, avec les caractères qui viennent d'être indiqués, qu'*en présence d'un excès de fluorure de sodium dissous*. Nous en avons conservé ainsi dans une solution à demi saturée de sulfate ammonique, où ils sont insolubles. Lorsqu'on veut les recueillir, soit par filtration, soit par centrifugation, la méthémoglobine fluorée se décompose. La purée cristalline perd sa couleur rouge spéciale, devient brunâtre et l'on constate au spectroscope qu'on n'a plus affaire qu'à de la méthémoglobine ordinaire.

***

On ne peut tirer de cette instabilité de la *méthémoglobine fluorée*, séparée des eaux-mères, un argument contre son existence. La chimie fournit assez d'exemples d'instabilités analogues : le bromhydrate de bromure de cuivre ne peut exister qu'en présence d'un excès d'acide bromhydrique ; l'hydrate de chlore n'est stable qu'en présence d'un excès de chlore. On a même obtenu des fluorures de diazoïques, plus ou moins instables [1]. Enfin, l'acide fluoplombique est encore plus instable que notre méthémoglobine fluorée et ne peut exister qu'en solution.

***

MM. Piettre et Vila n'ont pas voulu admettre que, comme nous l'avons démontré dans le chapitre précédent, la bande qu'ils ont observée à $\lambda = 634$, en examinant des solutions sanguines sous 20^{cm}, n'est autre que la bande de la méthémoglobine. Ils ont préféré nier l'existence de la méthémoglo-

[1] Hantzsch et Vock. — D. ch. G., **36**, 2059 (1903).

bine, en se basant sur des assertions gratuites (C. R., **140**, 1351) ou sur d'anciennes expériences de Bohr (P. et V., Bull. Soc. chimiq. (3), **33**, 578), réfutées par Hüfner en 1894[1]. Ils continuent donc à attribuer à l'*oxyhémoglobine*[2] la bande à $\lambda = 634$. C'est donc l'*oxyhémoglobine* qui, pour eux, donne, sous l'influence des fluorures, la bande de Menzies qu'ils appellent « la caractéristique optique du fluor ».

Action comparée de NaF sur l'oxyhémoglobine et la méthémoglobine

A l'examen spectroscopique sous faible épaisseur et à la température du laboratoire (15°-20°), l'addition de NaF à des solutions de méthémoglobine et à des solutions d'oxyhémoglobine, donne, comme nous l'avons constaté[3], immédiatement le spectre de la méthémoglobine fluorée avec la méthémoglobine et ne modifie pas le spectre de l'oxyhémoglobine.

Ceci fournit donc, comme nous l'avons dit, une démonstration nouvelle de cette opinion que les absorptions que, dans ces conditions, présente, dans le vert, le spectre de la méthémoglobine dite acide ne sont pas dues à un reste d'oxyhémoglobine. Ces absorptions disparaissant sous l'action de NaF, tandis que persistent dans les mêmes conditions les bandes de l'oxyhémoglobine.

Ce fait, d'autre part, n'est pas contraire à la manière de voir actuelle du professeur Bertin-Sans, qui attribue en partie ces absorptions à la méthémoglobine alcaline, et que j'ai soutenue plus haut. Nous avons vu, en effet, qu'une petite quantité de méthémoglobine alcaline peut être trans-

[1] Eng. Archiv f. Physiol., **1894**, 130.
[2] P. et V. Bull. Soc. chimiq., 5 octobre 1905, p. 1083.
[3] Ville et Derrien, Bullet. Soc. chimiq. (3), **33**, 858 (1905).

formée en méthémoglobine fluorée par une quantité suffisante de NaF.

Donc l'action de NaF est nettement différente quand on examine, sous faible épaisseur, immédiatement après leur fluoration, les solutions d'oxyhémoglobine et celles de méthémoglobine. Si l'on prolonge l'observation, on verra à la longue (au bout d'au moins six heures à 15°) apparaître la bande de Menzies dans lasolution qui ne donnait primitivement que le spectre de l'oxyhémoglobine. C'est que l'oxyhémoglobine, suivant son habitude, s'est méthémoglobinisée. En effet, la carboxyhémoglobine, qui résiste mieux aux agents méthémoglobinisants, ne présente, dans les mêmes conditions, la bande de Menzies que beaucoup plus tard.

Application à la recherche de la méthémoglobine

Nous avons dit, le professeur Ville et moi, que la grande visibilité de la *bande de Menzies* pourrait servir à la recherche de la méthémoglobine[1].

Nous avons ainsi constaté qu'une solution de méthémoglobine qui, vue sous 5^{cm}, laissait à peine deviner la bande à $\lambda = 634$, donnait par NaF une bande de Menzies encore visible sous $2^{cm}5$.

On peut donc, par addition de fluorure de sodium et examen consécutif immédiat, doubler la sensibilité de la méthode ordinaire de recherche de la méthémoglobine (qui décèle les quantités de méthémoglobine pouvant avoir une signification en toxicologie ou en clinique).

Avec l'examen spectroscopique sous grande épaisseur, sans les précautions difficiles à réaliser que j'indiquais, on trouverait de la méthémoglobine partout, étant donnée la

[1] C. R, **140**, p. 743, en note (1905).

facilité avec laquelle s'amorce la méthémoglobinisation de l'oxyhémoglobine.

Mais comme cette méthémoglobinisation, qui s'amorce si facilement, ne se continue que très lentement à la température ordinaire, on ne peut craindre qu'elle soit l'origine d'une quantité de méthémoglobine décelable par l'examen sous faible épaisseur et que l'on puisse confondre avec la méthémoglobine pathologique.

La trop grande sensibilité d'un procédé de recherche peut être quelquefois un inconvénient.

Application à la recherche des fluorures

La *méthémoglobine* donnant, sous l'influence des fluorures, un spectre nettement caractérisé (bande de Menzies) devient un réactif sensible des composés fluorés, comme par sa transformation en cyanométhémoglobine (large bande à $\lambda = 534$), elle est un réactif sensible de l'acide prussique (Kobert et ses élèves).

En employant la méthémoglobine : on peut avoir un réactif constant et des résultats comparables, ce qu'on ne peut espérer en employant des mélanges variables d'oxyhémoglobine et de méthémoglobine provenant d'oxyhémoglobine partiellement méthémoglobinisée. Enfin, on peut avoir une sensibilité grande *tout en conservant les avantages de l'examen spectroscopique sous faible épaisseur*. Dans certains cas, on pourra augmenter la sensibilité de la méthode autant qu'on le voudra en diminuant la quantité de réactif (méthémoglobine) tout en augmentant l'épaisseur du liquide soumis à l'examen spectroscopique.

Pour être logiques avec eux-mêmes, MM Piettre et Vila sont obligés d'opérer constamment avec des tubes de 20 ^{cm},

puisque pour eux la « caractéristique optique du fluor » consiste dans le *déplacement* de $\lambda = 634$ à $\lambda = 612$ de la bande du spectre de l'oxyhémoglobine qu'on ne voit que sous une grande épaisseur [1].

Dans l'emploi de la méthémoglobine à la recherche des fluorures, il faudra tenir grand compte des propriétés de la *méthémoglobine fluorée* précédemment indiquées. C'est ainsi que, puisqu'elle ne peut se former en milieu alcalin qu'en présence d'un grand excès de fluorure, il vaudra mieux opérer en milieu toujours légèrement acide. Éviter pour les mêmes raisons la présence de l'acide cyanhydrique. En présence de *nitrites*, la réaction sera moins nette puisque la bande à $\lambda = 634$ est remplacée alors non par *la bande de* MENZIES ($\lambda = 612$), mais par une bande à $\lambda = 620$. Se rappeler aussi que la méthémoglobine fluorée redonne de la méthémoglobine, s'il y a peu de fluorure en présence de beaucoup de sels neutres étrangers.

*
* *

Nous avons récemment, le professeur VILLE et moi, à la suite de ces considérations, décrit un *nouveau procédé de recherches des antiseptiques fluorés dans les substances alimentaires*, qui doit prochainement paraître dans le *Bulletin de la Société chimique de Paris*. Nous pensons que l'*hygiène* y trouvera un procédé utile, parce que nous nous sommes attachés à le rendre aussi simple, aussi facile et aussi rapide que possible. Dans la majorité des cas, l'examen spectroscopique d'une petite quantité de liquide, contenu dans un simple tube à essais, peut suffire.

[1] A la suite de notre note sur le rôle que joue la méthémoglobine dans ces phénomènes (C. R., 13 mars 1905), MM. Piettre et Vila ont reconnu que l'oxyhémoglobine « naturellement ou artificiellement *vieillie* » donnait la bande à $\lambda = 634$ sous faible épaisseur (Bull. Soc. chimiq., 5 mai 1905).

PRINCIPALES CONCLUSIONS

La méthémoglobine est un composé ni mieux ni moins bien défini que l'oxyhémoglobine.

Il est même plus facile, étant données les deux conclusions suivantes, d'obtenir de la méthémoglobine pure d'oxyhémoglobine que de l'oxyhémoglobine pure de méthémoglobine.

En dehors du globule rouge et au-dessus de 0°, l'oxyhémoglobine est toujours mêlée de plus ou moins de méthémoglobine.

Les deux absorptions intermédiaires du spectre de la méthémoglobine brune (dite acide) ne sont pas dues à un reste d'oxyhémoglobine non transformée.

La variabilité de leur aspect, source des anciennes discussions, tient à ce que les solutions de méthémoglobine brune peuvent contenir plus ou moins de méthémoglobine rouge (dite alcaline).

La méthémoglobine brune et la méthémoglobine rouge paraissent être, en effet, la forme ordinaire et la forme *aci* de la méthémoglobine considérée comme un *pseudo-acide*.

L'ammoniaque non ionisée (ammoniaque en présence des sels ammoniacaux) ne réagit pas sur la méthémoglobine

comme l'ammoniaque ionisée. Au lieu du spectre de la méthémoglobine alcaline, on obtient alors un nouveau spectre : large bande vers $\lambda = 534$, et faible absorption commençant un peu avant D et se renforçant vers $\lambda = 568$.

L'*acidhémoglobine* de Harnack semble n'être qu'un mélange de méthémoglobine et d'hématine.

Les *nitrites* ne sont pas de simples producteurs de méthémoglobine. La formation d'azoxyhémoglobine, sous leur action, peut expliquer les accidents tardifs signalés après les inhalations de nitrite d'amyle.

Les résistances différentes de l'hémoglobine des différents sangs à la méthémoglobinisation, mesurées par le temps que met à devenir visible la bande à $\lambda = 634$, tiennent surtout à des différences d'alcalinité du sang.

L'examen spectroscopique sous grande épaisseur permet d'apercevoir les premières phases de la méthémoglobinisation de l'oxyhémoglobine qui échappaient à l'examen ordinaire.

La bande d'absorption dans le rouge, signalée, dans ces conditions d'observation, par M. de Thierry et MM. Piettre et Vila, et attribuée par ces auteurs au spectre de l'oxyhémoglobine, n'est autre que la bande à $\lambda = 634$ de la méthémoglobine.

La méthémoglobine donne, avec les fluorures, une combinaison, que l'on peut obtenir à l'état cristallisé, mais qui n'est stable alors qu'en présence d'un excès de fluorure dissous.

Cette *méthémoglobine fluorée* (Ville et Derrien) présente un spectre caractéristique à deux bandes à $\lambda = 612$ et $\lambda = 494$.

La bande principale, que Ville et Derrien proposent d'appeler *bande de Menzies*, se distingue nettement de la bande de la méthémoglobine (à $\lambda = 634$) : elle est environ deux fois plus visible et située plus à droite ($\lambda = 612$).

Il y a là une réaction à la fois de la méthémoglobine et des fluorures.

Vu et permis d'imprimer :
Montpellier, le 15 février 1906
Le Recteur :
Ant. BENOIST.

Vu et approuvé :
Montpellier, le 15 février 1906.
Le Doyen :
MAIRET.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

PREMIÈRE PARTIE

DEUXIÈME PARTIE

TROISIÈME PARTIE

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes chers Condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être Suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.